

Dosage immunométrique à deux sites de la β – lactoglobuline bovine

Recherche de molécules étrangères antigéniques

kit
24 barrettes
de 8 puits

Informations reception du kit

Les produits lyophilisés, **peuvent rester plusieurs jours à température ambiante** donc si le colis reste dans un casier, quelques jours, cela n'endommage pas les produits.

=> Les **réactifs sous forme de poudre** (lyophilisées), peuvent être conservés en bas du réfrigérateur à 4°C plusieurs mois.

=> Les **réactifs reconstitués (sauf Ellmann)** peuvent être conservés plusieurs semaines à 4°C ou plusieurs mois sous forme congelée (cf p7). Le **réactif d'Ellmann**, une fois reconstitué, ne peut pas être conservé.

Kit de dosage développé par le Service de Pharmacologie et d'Immunologie de Saclay, Direction des Sciences du Vivant du CEA, en liaison avec l'APBG

M. Eric Ezan et M. Jacques Grassi du CEA

avec la collaboration pédagogique de Eliane Vernet, Bernard Mogenet et Jean Ulysse de l'APBG

apbg CEA
Bertin Technologies

Dosage immunométrique à deux sites de la β – lactoglobuline bovine

Ce kit pédagogique est conçu en collaboration avec le CEA. Il permet de faire réaliser en une seule séance de TP, un dosage immunométrique.

I – Principe du dosage

Il s'agit d'un dosage immunométrique fondé sur l'utilisation de deux anticorps monoclonaux dirigés contre deux épitopes différents de la β -Lactoglobuline bovine (Blg). Un de ces anticorps, appelé anticorps de capture, est immobilisé sur un support solide (puits d'une plaque de microtitration en polystyrène). En réagissant l'anticorps de capture va immobiliser l'antigène sur le fond du puits.

La présence de l'antigène sur la phase solide sera mise en évidence à l'aide d'un deuxième anticorps monoclonal, appelé anticorps traceur, qui est couplé chimiquement (anticorps marqué) à une enzyme, l'acétylcholinestérase (AChE). Quand l'anticorps traceur (Conjugué enzymatique) aura réagi avec la Blg, l'enzyme sera, elle aussi, indirectement fixée sur le support en quantité proportionnelle à la quantité d'antigène introduite dans le dosage.

Ce type de dosage est aussi appelé «dosage sandwich». L'antigène est littéralement pris en sandwich entre les deux anticorps monoclonaux.

En mesurant l'activité de l'enzyme immobilisée, on peut accéder indirectement à la concentration de l'antigène dans la solution testée. Pour obtenir une mesure quantitative on se réfère à la courbe d'étalonnage établie à l'aide de concentrations connues d'antigène.

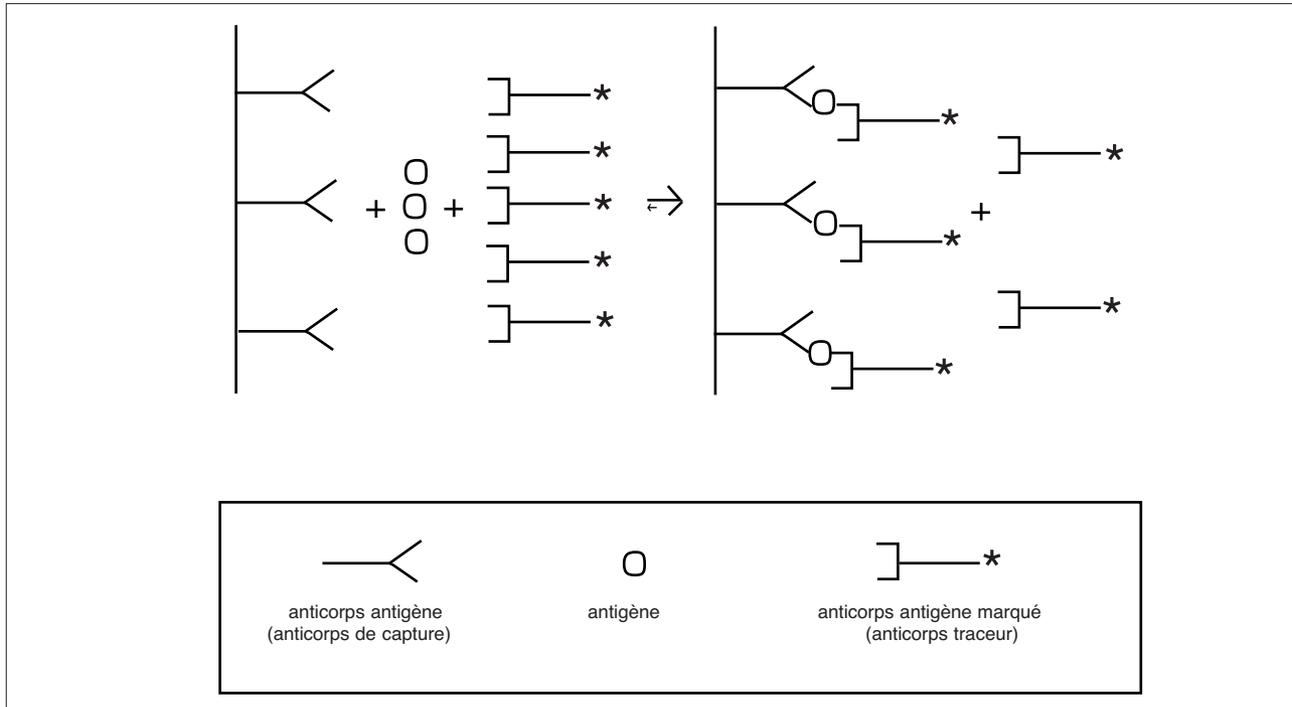


Figure 1 - Principe du dosage immunométrique de type «sandwich».

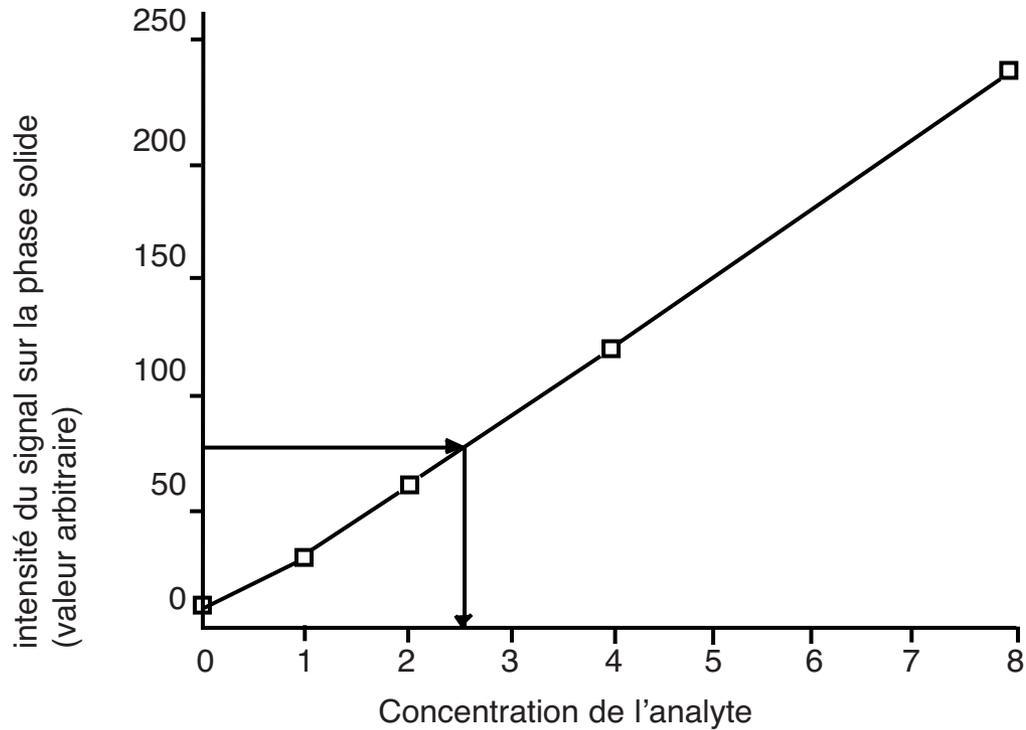


Figure 2 - Exemple d'une courbe d'étalonnage d'un dosage immunométrique à deux sites.

Le dosage peut être réalisé en une ou deux étapes, pour des raisons de commodité et pour raccourcir la durée du dosage nous avons choisi la méthode en « 1 temps » dans laquelle l'antigène et l'anticorps marqué sont ajoutés simultanément dans les puits de la plaque de microtitration.

II - Matériel

1 - Contenu du kit (à conserver à +4°C avant utilisation)

- ☞ **24 barrettes** sèches de 8 puits, contenant l'anticorps de capture, prêtes à l'emploi ;
- ☞ **2 flacons** (*bouchon vert - BLG Tracer*) de **traceur** (conjugué enzymatique) (anticorps-acétylcholinestérase) : chaque flacon est à reprendre avec 10 ml d'eau pure ;
- ☞ **1 flacon** (*bouchon gris - BLG standard*) de la **β -lactoglobuline lyophilisée étalon** en quantité connue (500ng) ;
- ☞ **3 flacons de réactif d'Ellman** lyophilisé (substrat) : chaque flacon est à reprendre avec **50 ml d'eau pure**.

Chaque trousse contient tous les réactifs nécessaires au dosage à l'exception de l'eau pure utilisée pour reconstituer les réactifs lyophilisés, réaliser les témoins négatifs et la solution de lavage.

2 - Matériel et produits non fournis

- pipettes ;
- une pissette ;
- eau pure ;
- échantillons biologiques à tester (lait de vache, lait de soja, lait hypoallergénique, fromage, biscuits, ...).

III - Mode opératoire

1 - Principe de la manipulation

Il s'agit d'un dosage en 5 étapes :

① Placer dans chacun des puits 100 μ l de la solution à tester (Blg étalon, eau pure, lait de vache dilué, jus de biscuit, etc.) et 100 μ l d'anticorps traceur (Conjugué enzymatique).

La Blg étalon servira de témoin positif (= présence d'antigène).

L'eau pure (p7), témoin négatif (= absence d'antigène), permettra d'évaluer la «liaison non spécifique».

Il y a toujours, en effet, une faible proportion de l'anticorps traceur qui s'adsorbe de façon non spécifique sur le support solide.

② Laisser réagir. La réaction immunologique (formation des complexes antigène-anticorps) demande environ 20 minutes à la température ambiante.

③ Laver à l'eau pure les plaques pour éliminer l'excès d'anticorps traceur n'ayant pas réagi.

④ Ajouter dans chaque puits le réactif d'Ellman (substrat) qui contient les réactifs permettant de mesurer l'activité enzymatique de l'AChE. Laisser agir. La réaction enzymatique conduit à l'apparition d'une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'enzyme immobilisée (Voir dans informations complémentaires - p. 12 - le détail de la réaction enzymatique).

⑤ Lire les résultats après 10 minutes soit à l'oeil nu en évaluant l'intensité de la coloration, soit avec un colorimètre en mesurant l'absorbance (412 nm).

2 - Reconstitution des réactifs lyophilisés avec de « l'eau pure ».

▶ Les fioles contenant les réactifs lyophilisés (anticorps traceur, étalon, substrat) sont bouchées sous vide. Il faut les ouvrir doucement, de façon à éviter de disperser la poudre hors de la fiole.

▶ « L'eau pure » utilisée pour reconstituer les réactifs peut être de l'**eau distillée, désionisée** ou **osmosée**. **Ne pas utiliser d'eaux minérales riches en calcium ou magnésium** ou nitrates, ces deux cations formant des précipités avec le tampon phosphate présent dans les réactifs. Certaines eaux de ville peuvent convenir, mais il y a un risque de contamination par des pesticides qui pourraient inhiber l'AChE. *Vous pouvez utiliser une eau minérale appartenant au groupe des eaux très peu minéralisées.*

– *Lyophilisat d'anticorps traceur (conjugué anticorps - acétylcholinestérase)(pour chaque flacon)*

Le lyophilisat doit être mélangé dans 10 ml d'eau pure (équilibrée à la température de la pièce). Une fois en solution, l'anticorps marqueur peut être conservé plusieurs semaines à 4°C ou plusieurs mois sous forme congelée (- 20°C).

– *Lyophilisat de la Blg en quantité connue (500 ng)*

Le lyophilisat doit être mélangé dans 5 ml d'eau pure (équilibrée à la température de la pièce). Cette solution étalon (100 ng/ml) sera utilisée comme témoin positif. Elle peut être conservée plusieurs semaines à 4°C ou plusieurs mois sous forme congelée (- 20°C).

– *Lyophilisat du réactif d'Ellman (substrat)*

Le lyophilisat doit être mélangé dans 50 ml d'eau pure (50 ml pour chaque flacon). Il est à noter que seulement 19,2 ml sont nécessaires pour 12 barrettes de 8 puits (0,2ml/puit). La solution peut être conservée 2 ou 3 jours à 4°C, à l'abri de la lumière. Cette solution contient tous les réactifs (substrat, chromophore, tampon) nécessaires à la mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase (voir ci-après). Ce réactif est plus instable que les autres, c'est la raison pour laquelle il est fourni en 3 exemplaires. Ceci permet d'étaler, l'utilisation du kit sur 3 séances différentes.

Vous pouvez le conserver avant reconstitution (poudre) au congélateur ou réfrigérateur selon la durée de conservation.

3 - Préparation des échantillons à tester (*voir p9, 1 goutte = 50 µl*)

Dilution d'une goutte de lait de vache dans un litre d'eau (eau pure, eau du robinet éventuellement).

Il est important de bien respecter le facteur de dilution soit 1 goutte/l. Une concentration plus importante (3 ou 4 gouttes/l), ou beaucoup plus faible, pourrait aboutir à une diminution du signal. En effet, dans ce type de dosage, on observe un « effet crochet », quand l'antigène est trop concentré. Dans ce cas, l'antigène traceur forme, avec la Blg, des complexes qui ne se fixent pas sur la phase solide et qui sont éliminés au cours de l'étape de lavage ; ce qui aboutit à une diminution du signal mesuré.

Remarques :

- il est à noter que le lait de chèvre contient de la Blg très bien détectée par le dosage ;
- le dosage peut être utilisé pour mettre en évidence la présence de lait de vache dans différents produits alimentaires (biscuits, gâteaux, fromages ...). Pour les échantillons solides, il est possible

d'extraire les protéines (au moins en partie) en les broyant dans de l'eau pendant quelques minutes. En absence de données précises, l'échantillon devra être dosé à différentes dilutions afin d'obtenir le signal optimum (« l'effet crochet » aboutit à une diminution du signal quand la concentration de Blg est trop forte) ;

– on peut rechercher la présence de Blg dans certains laits hypoallergéniques vendus en pharmacie. Mais, pour diminuer les risques de réaction allergique, ces laits sont traités par des protéases qui détruisent les protéines ; ce qui aboutit à une perte de reconnaissance de la Blg par les anticorps.

4 - Distribution des réactifs.

Les réactifs peuvent être distribués soit avec une pipette de précision (volumes exprimés en μl) soit avec une **pipette Pasteur** (volumes exprimés en gouttes : gts).

Si les pipettes doivent être réutilisées, il est important de les identifier et de ne les utiliser que pour un seul type de réactif afin d'éviter de contaminer les réactifs entre eux. Par exemple, il ne faut pas utiliser une pipette qui a servi à distribuer le témoin positif (étalon Blg) pour distribuer l'eau pure dans les témoins négatifs. De même, il ne faut pas distribuer le réactif d'Ellman avec une pipette qui a été utilisée pour l'anticorps marqueur (conjugué enzymatique).

5 - Elimination des produits.

L'élimination des produits peut se faire « à l'évier» (tampon Ph 7,4, aqueux).

IV - Manipulation

A titre indicatif, nous suggérons les dispositions suivantes :

- chaque groupe de TP aura une barrette de huit puits ;
- chaque dépôt de solution à tester se fera en double (dans 2 puits).

NB : il est possible d'utiliser une barrette de 8 puits pour deux groupes d'élèves. Ce qui permet d'utiliser un kit avec deux classes de terminale S.

① Placer 100 μl (ou 2 gouttes) de solution à tester comme indiqué figure 3.

Puis placer 100 μl (ou 2 gouttes) d'anticorps traceur dans chaque puits en commençant par les témoins négatifs.

- | | |
|-----------------------|---|
| <input type="radio"/> | } Témoin négatif, 100 μl (ou 2 gouttes) d'eau pure par puits. |
| <input type="radio"/> | |
| <input type="radio"/> | } Témoin positif, solution étalon de Blg à 100 ng. ml^{-1} , 100 μl (ou 2 gouttes) par puits. |
| <input type="radio"/> | |
| <input type="radio"/> | } Echantillon de lait de vache, 1 goutte/ 1 d'eau pure, 100 μl (ou 2 gouttes) par puits. |
| <input type="radio"/> | |
| <input type="radio"/> | } Echantillons divers, 100 μl (ou 2 gouttes) par puits. |
| <input type="radio"/> | |

② Laisser reposer la plaque pendant 15 à 20 minutes à température ambiante (réaction immunologique). Il est possible d'accélérer la réaction immunologique en effectuant cette étape à une température supérieure (par exemple 30 °C, la réaction dure 10 à 15 minutes). Ne jamais dépasser 37 °C, il y aurait inactivation de l'AChE.

③ Laver abondamment la barrette avec de l'eau pure ou avec un tampon phosphate (10^{-2} M, pH 7,4). Utiliser une pissette.

④ Placer dans chaque puits 200 μ l (ou 4 gouttes) de solution du réactif d'Ellman (substrat).

⑤ Suivre le développement de la coloration jaune à l'oeil nu ou à l'aide d'un spectrophotomètre adapté (lecteur de plaque, mesure à 412 nm). La couleur apparaît après 3 à 4 minutes et est optimale après 10 à 15 minutes.

V - Résultats

Comparer à l'oeil nu la couleur du témoin négatif à celles du témoin positif et des autres échantillons. S'il a été possible de faire une mesure d'absorbance à 412 nm, la concentration de la Blg dans les échantillons peut être calculée en appliquant la formule suivante :

$$(C, \text{ en ng.ml}^{-1}) = \left[\frac{\text{absorbance de l'échantillon}}{\text{absorbance de l'étalon}} \right] \times 100 \times \text{Facteur de dilution}$$

Le facteur de dilution pour le lait de vache (1 goutte/l) est d'environ 1 / 20 000. (1 goutte = \pm 50 μ l).

A titre indicatif voici les résultats (absorbance 412 nm) obtenus dans une expérience de ce type après 10 minutes de réaction enzymatique :

- témoins négatifs : 0,009 et 0,010
- témoins positifs : 0,769 et 0,796
- lait de vache dilué: 0,574 et 0,571

Dans ce cas, la concentration de Blg mesurée dans le lait de vache est de $1,46 \text{ mg.ml}^{-1}$

VI - Informations complémentaires

La β -Lactoglobuline bovine (Blg)

C'est un des composants principaux du lait de vache. C'est, après la caséine la plus abondante des protéines (environ 3 mg par litre de lait).

Elle est composée de 162 acides aminés pour une masse molaire de 183 000. Sa structure primaire et tridimensionnelle ont été déterminées.

Elle appartient à la famille des Lipocalines capable de transporter des ligands hydrophobes.

Sa fonction biologique serait d'assurer le transport du rétinol, un précurseur de la vitamine A.

La β -Lactoglobuline n'est pas présente dans le lait humain et on la suspecte d'être responsable de certaines allergies au lait observées chez les enfants.

L'acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase joue un rôle très important dans le système nerveux central et périphérique

en hydrolysant le neurotransmetteur acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques. Pour situer l'importance physiologique de l'AChE, il suffit de rappeler que la plupart des neurotoxiques utilisés dans la guerre chimique (sarin, tabun, VX) et de nombreux insecticides sont des inhibiteurs de cette enzyme.

L'AChE utilisée dans ce dosage a été purifiée à partir des organes électriques de Gymnote. Ce poisson qui vit dans les bassins de l'Orénoque et de l'Amazone possède de très gros organes électriques qui lui permettent d'envoyer des décharges électriques très importantes (700v sous plusieurs ampères).

L'enzyme de Gymnote est caractérisée par une formidable efficacité catalytique puisqu'elle est capable de catalyser l'hydrolyse de 16 000 molécules de substrat par seconde. Pour cette raison son activité peut être détectée de façon très sensible.

Pour ce faire, on utilise couramment le dosage décrit par Ellman et coll. en 1961. Cette méthode est fondée sur l'utilisation d'un pseudo-substrat (l'acétylthiocholine) qui, après hydrolyse, conduit à la formation de thiocholine porteuse d'une fonction thiol. Celle-ci réagit immédiatement avec le DTNB. (5-5'-dithiobis-nitobenzoate) qui, sous forme réduite, absorbe fortement dans le visible :

$$\epsilon_M = 13\ 600 \text{ à } 412 \text{ nm}$$

A l'aide de la méthode d'Ellman il est possible de détecter les concentrations d'enzyme de l'ordre de 10^{-14} M et des quantités de l'ordre de l'attomole (10^{-18} mol).

L'AChE, couplée à des molécules d'anticorps ou d'antigènes (brevet CEA), permet d'obtenir des traceurs à très haute activité spécifique et conduit à l'obtention de dosages immunologiques très sensibles.

TP : REACTION ANTIGENE-ANTICORPS

Problème

Comment se caractérise une réaction antigène-anticorps en recherchant un antigène connu ?

Matériel à disposition

- une solution de β - Lactoglobuline bovine (Blg) à 100 ng.ml^{-1} ;
- une barrette de 8 puits contenant un anticorps anti-Blg (Ac1) ;
- une solution d'anticorps traceur = complexe entre anticorps anti-Blg (Ac2) et une enzyme (acétylcholinestérase) en Conjugué enzymatique ;
- une solution de réactif d'Ellman (substrat) permettant de mesurer l'activité de l'enzyme ;
- des solutions contenant des antigènes divers :
 - ① = lait stérilisé dilué dans de l'eau pure (1 goutte de lait par litre d'eau),
 - ② = lait UHT dilué dans de l'eau pure (1 goutte de lait par litre d'eau),
 - ③ = lait cru (*ou lait entier pasteurisé*) dilué dans de l'eau pure (1 goutte de lait par litre d'eau),
 - ④ = lait hypoallergénique dilué dans de l'eau pure (1 goutte de lait par litre d'eau),
 - ⑤ = lait de chèvre dilué dans de l'eau pure (1 goutte de lait par litre d'eau),
 - ⑥ = jus de pain ou de biscuit filtré,
 - ⑦ = β - Lactoglobuline de concentration connue,
 - ⑧ = d'autres solutions sont susceptibles d'être testées (voir le matériel disponible sur la paillasse) ;
- de l'eau pure.

Principe de la manipulation

Il s'agit d'un dosage de type « sandwich ». Deux anticorps anti-Blg (Ac1 et Ac2), dirigés contre deux épitopes différents de Blg, sont utilisés :

- l'Ac1 est fixé dans le fond des puits de la barrette ;
- l'Ac2 est couplé à une enzyme (acétylcholinestérase) permettant une réaction colorée (coloration jaune) en présence du réactif d'Ellman.

Le réactif d'Ellman contient le substrat de l'acétylcholinestérase. La réaction ainsi catalysée fournit un produit de couleur jaune.

L'activité enzymatique permet de mettre en évidence le couple Ac2 - acétylcholinestérase fixé et par conséquent la concentration de l'Ag (Blg). L'intensité colorimétrique permet de faire des mesures quantitatives donc de doser la Blg.

Protocole expérimental

Placer dans chacun des 8 puits une solution différente parmi les suivantes :

- puits 1: 100 μl d'eau pure (100 μl a pour équivalent approximatif 2 gouttes) ;
- puits 2 : 100 μl de solution de Blg ;
- puits 3 à 8 : 100 μl , par puits, l'une des solutions d'antigène.

Ajouter dans chaque puits 100 μl de la solution de traceur ;

Laisser reposer 30 min à température ambiante ou 15 min à 30°C ;

Vider le contenu de la barrette (en secouant énergiquement) (Conjugué enzymatique) ;

Laver à l'eau pure pour éliminer l'excès d'anticorps traceur n'ayant pas réagi ;

Éliminer l'eau de lavage (en secouant énergiquement) ;

Ajouter dans chaque puits 200 μl de solution d'Ellman (Substrat) ;

Laisser agir 10 min ;

Observer les colorations.

Résultats

Dessiner la barrette de puits en indiquant son contenu ;

Noter la couleur de chaque puits.

Protocole expérimental

Interpréter ces résultats en représentant, de manière schématique, ce qui s'est produit dans chaque puits ;

Justifier comment la modification de couleur peut traduire la présence de Blg ?

Compte-tenu de la nature et des propriétés des protéines, tirer une conclusion générale.

L'APBG, le CEA et Bertin Technologies ne sauraient être, en aucun cas, tenus responsables d'un préjudice direct ou indirect dû à un mode d'utilisation des réactifs constitutifs non conforme au protocole d'expérience indiqué.



Direction des Sciences du Vivant du CEA
Service d'Immunologie
CEA/Saclay
91191 GIF-SUR-YVETTE CEDEX

© APBG décembre 1996

Siège : 106 av. F. de Pressensé 69200 Vénissieux
SIRET 784 262 446 00031

APBG Commandes
BP 18337 - 69631 VENISSIEUX CEDEX

☎ 04 78 74 47 22

✉ apbg@orange.fr

www.apbg.org

Bertin Technologies

Parc d'Activités du Pas du Lac - 10 bis rue Ampère
78180 Montigny le Bretonneux

☎ 01 39 30 60 00

<https://www.bertin-technologies.fr/>