Faculté des sciences
Piona DARIAVACH, Mic A

Détermination de l'isotype et de la concentration d'IgG d'un hybridome de souris par la technique de l'ELISA

CONDORI Brunella, GOURGUECHON-BUOT Elia, PEREZ Valérie

Introduction

Dans de nombreux procédés, il est capital de pouvoir déterminer avec précision la concentration d'une solution pour une molécule donnée. Le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) permet non seulement de déterminer des concentrations précises pour de très nombreuses molécules, il est également facile à mettre en oeuvre. Ce test peut également être utilisé qualitativement, par exemple pour déterminer la nature des chaînes d'anticorps. Nous allons dans ce TP utiliser cette méthode pour déterminer l'isotype et la concentration de l'IgG présent dans le surnageant d'un hybridôme de souris.

Principe

La méthode utilisée ici est appelée ELISA sandwich direct (voir annexe 1). Elle consiste à fixer l'antigène étudié par un anticorps dirigé contre lui, et à le détecter en utilisant un autre anticorps reconnaissant l'antigène et couplé à une enzyme (la péroxydase), qui permettra la détection après ajout de son substrat (H_2O_2) par la formation d'un produit bleu. La réaction est stoppée avec de l'acide sulfurique (qui a aussi pour effet de provoquer un changement de couleur vers le jaune). La densité optique des différents puits est ensuite déterminée par spectrophotométrie. Ici, l'antigène a la particularité d'être aussi un anticorps.

Les puits sont d'abord « coatés » avec différents anticorps reconnaissant les IgG de souris:

- pour la détermination de la concentration (puits B2 à B8, C2 à C8, D2 à D8), des anticorps polyclonaux de chèvre anti-IgG (reconnaissance indépendante de l'isotype de l'IgG) ;
-pour la détermination de la chaîne lourde, des anticorps polyclonaux de chèvre anti-IgG1 (puits E2 et E3), anti-IgG2 (puits E4 et E5) et anti-IgG3 (puits E6 et E7) ;
- pour la détermination de la chaîne légère, des anticorps monoclonaux de rats anti-kappa (puits F2 et F3) et anti-lambda (puits F4 et F5).

L'étape suivante consiste à saturer les puits en protéines grâce à une solution de lait dilué : cela empêche les liaisons non spécifiques au plastique des puits.

Les puits B2, C2 et D2 servent de blancs : ce sont des témoins négatifs qui permettent de déterminer une absorbance non spécifiques de la fixation de l'anticorps de détection à l'antigène.

Différentes solutions sont ensuites rajoutées dans les puits :

- Dans les puits B3 à B8 : les solutions de l'IgG standard, dans l'ordre croissant de la concentration entre 3,1 ng/mL et 100 ng/mL ; ils permettent d'établir une gamme étalon. Cette gamme étalon est alors utiliser pour en déduire la concentration en IgG dans le surnageant de l'hybridôme.
- Dans les puits C3 à D8 : les solutions diluées de l'hybridôme (deux puits par concentration, dans l'ordre décroissant) ; ils permettent la détermination de la concentration en IgG dans le surnageant de l'hybridôme.
- Dans les puits E2 à E7 et F2 à F5 : la solution de l'hybridôme de dilution 20x ; ils permettent de déterminer l'isotype de l'IgG sécrété par l'hybridôme.

Après lavage, une solution d'anticorps anti-IgG de souris couplés à la péroxydase est rajoutée dans tous les puits. Après un autre lavage, le substrat de la péroxydase est ajouté ; la réaction est arrêtée après

l'apparition d'une coloration bleue suffisamment intense grâce à l'ajout d'acide sulfurique, qui provoque également l'apparition d'une coloration jaune.

La densité optique de chaque puits est mesurée grâce à un spectrophotomètre à 450nm.

Résultats :

Il n'y a pas eu d'apparition de coloration bleue dans les blancs (puits B2, C2 et D2) ; de plus leur absorbance est comparable à l'absorbance des puits non utilisés.

La valeur moyenne des blancs est soustraite de toutes les valeurs d'absorbance données pour l'hybridôme ou l'IgG standard. Pour les valeurs des dilutions de l'hybridôme, une moyenne est également réalisée et utilisée pour réaliser la courbe car deux puits sont utilisés pour chaque dilution.

-Détermination de l'isotype :

Une coloration bleue intense est apparue dans les puits E2 et E3 (contenant l'anticorps anti-IgG1) et F2 et F3 (contenant les anticorps anti-kappa). Aucune coloration n'est apparue dans les puits E4 à E7 et F4 et F5. La chaîne lourde est donc **IgG1** et la chaîne légère **κ**. Ces résultats sont comparables à ceux des autres binômes, nos résultats semblent donc pertinents.

-Détermination de la concentration :

En traçant la courbe étalon (annexe 2), on constate que celle-ci n'est pas exploitable : on observe tout d'abord une valeur aberrante pour la solution 6,25 ng/mL (qui n'est donc pas prise en compte). De plus les autres points ne forment pas une droite : la saturation apparaît très tôt (c'est pour cette raison que seules les quatre premières concentrations sont représentées). Cette saturation peut s'expliquer par le fait qu'à partir d'une certaine concentration en IgG, tous les anticorps recouvrant la cuve sont liés, et des IgG supplémentaires ne peuvent pas se fixer. Mais, nous pouvons aussi supposer qu'une trop faible quantité d'anticorps de capture s'est fixée dans les puits. Par conséquent, la saturation des anticorps arrive pour une faible concentration en antigène. Des erreurs de manipulation lors des lavages peuvent aussi mener à la saturation des anticorps de captures, en effet les anticorps ont pu être décrochés des puits par un lavage trop fort.

On peut constater en observant les résultats d'absorbance donnés en annexe 3 que les valeurs obtenues pour les dilutions de l'hybridôme ne sont pas exploitables. En effet, on observe des absorbances assez proches entre elles, allant de 0, 655 pour la solution 640x à 0,840 pour la solution 20x. Il semblerait que les concentrations sont trop importantes et qu'on obtient une saturation.

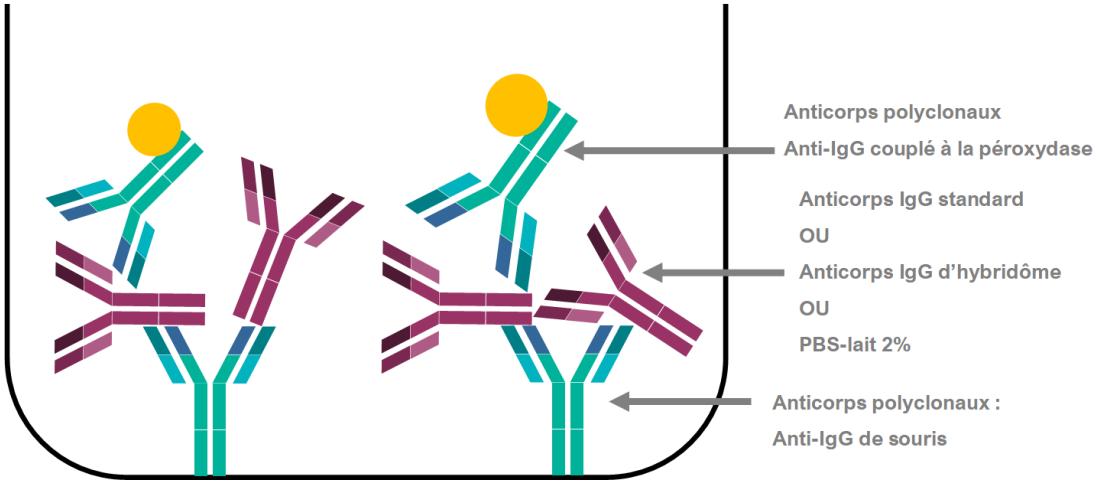
A titre d'exemple, nous allons tout de même exploiter nos résultats pour déterminer une concentration, pour cela nous allons utiliser la portion linéaire de la courbe (entre 0 et 3,1 ng/mL) ainsi que l'absorbance de la solution 640x. Nous n'utilisons que cette solution malgré le fait que d'autres concentrations aient une absorbance situées dans la partie linéaire, car comme nous pensons que la solution sature déjà à 640x, cette dernière nous offrira la valeur la plus proche de la réalité. On obtient en utilisant la courbe une valeur de 2,5 ng/mL, soit une concentration pour la solution non diluée de **1,6 µg/mL.**

Conclusion :

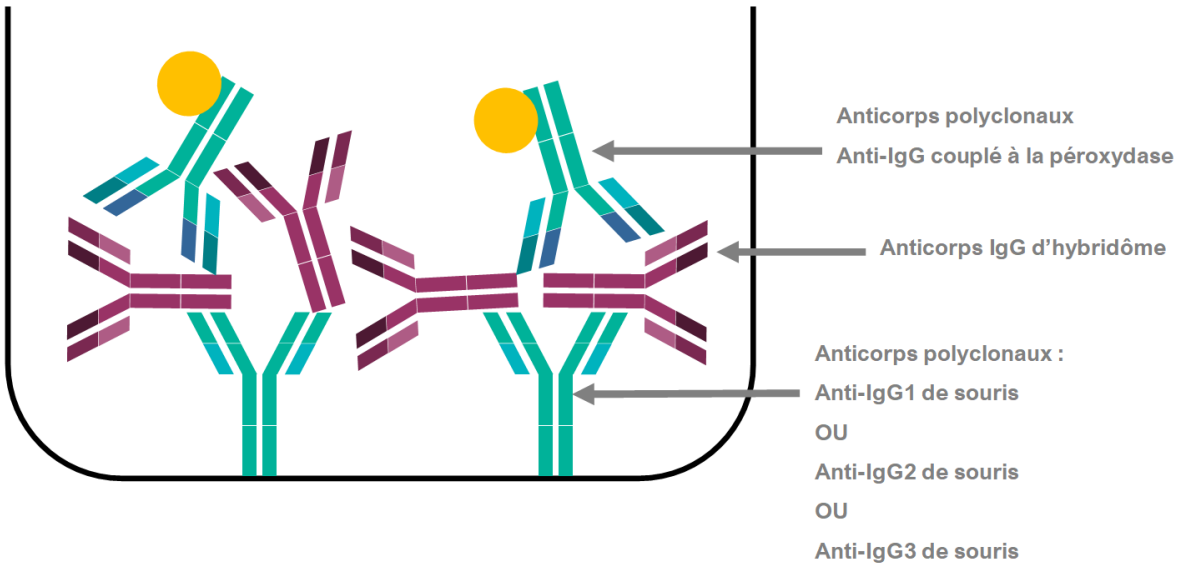
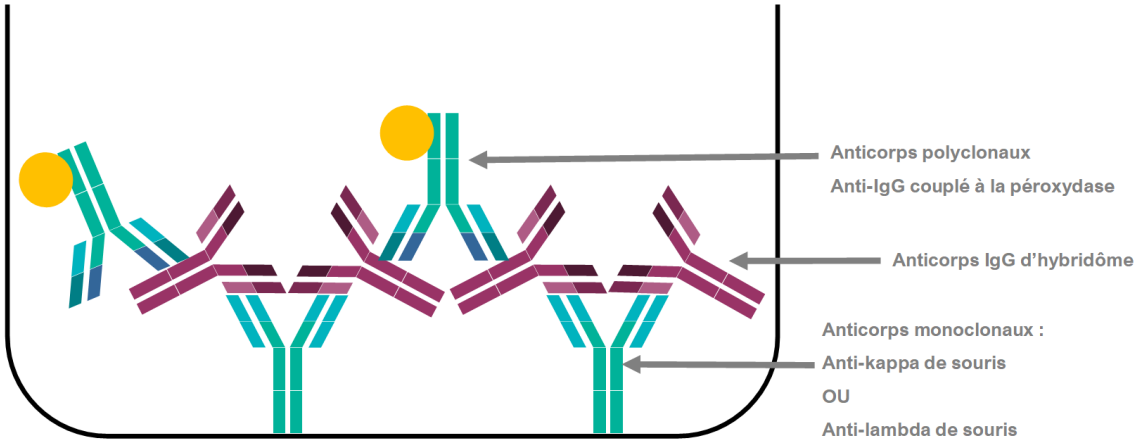
Nous n'avons pas obtenu de résultats interprétables vis à vis de la concentration en IgG sécrétés par l'hybridôme, même si nous avons pu déterminer son isotype (IgG1 - kappa). Donc, le résultat donné en exemple n'est pas exact et ne peut pas servir en tant que tel. Cependant, si on avait utilisé des dilutions plus nombreuses et plus grandes, on aurait pu obtenir des résultats pertinents avec peu de matériel (pas de grands volumes nécessaires). De plus, rien que par son aspect de détection, le test ELISA permet d'identifier un antigène connu ou tout du moins le déterminer à partir d'un nombre limité et connu de possibilités (détermination de l'isotype). C'est pourquoi, le test ELISA est aussi important et largement utilisé aujourd'hui.

Annexe 1 : Schéma du principe de l'ELISA sandwich

Puits B2 à B8, C2 à C8, D2 à D8



Puits E2 à E7



Puits F2 à F5