



HAL
open science

Dosage immunonéphélométrique des immunoglobulines G dans le lait de vache. I. Mise au point technique du dosage

J. P. Lebreton, F. Joisel, S. Boutleux, B. Lannuzel, F. Sauger

► **To cite this version:**

J. P. Lebreton, F. Joisel, S. Boutleux, B. Lannuzel, F. Sauger. Dosage immunonéphélométrique des immunoglobulines G dans le lait de vache. I. Mise au point technique du dosage. *Le Lait*, 1981, 61 (608), pp.465-480. hal-00928901

HAL Id: hal-00928901

<https://hal.science/hal-00928901v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Dosage immunonéphélométrique des immunoglobulines G dans le lait de vache

I. Mise au point technique du dosage

par

J. P. LEBRETON (1, 2), F. JOISEL (2, 3), S. BOUTLEUX (3)
B. LANNUZEL (4) et F. SAUGER (5)

INTRODUCTION

Aux termes de l'article 2 du décret du 25 mars 1924, modifié et complété par le décret n° 71-6 du 4 janvier 1971, est considéré comme impropre à la consommation humaine : le lait de vache provenant d'une traite opérée moins de 7 j après le part et, d'une manière générale, le lait contenant du colostrum.

En outre, en Haute-Normandie, pendant la période de l'année où s'effectue la majorité des vêlages, il a été constaté une augmentation notable du taux de matière protéique dans les fournitures de lait coïncidant avec une augmentation sensible de la fréquence d'apparition d'incidents particuliers dans les fabrications de l'industrie laitière : le gratinage précoce sur les plaques des pasteurisateurs et la chute des rendements fromagers [13]. Il est bien connu que les protéines solubles, α lactalbumine, β lactoglobulines et immu-

-
- (1) I.N.S.E.R.M. U-78, 543, chemin de la Bretèque - 76230 Bois-Guillaume (Directeur : C. Ropartz).
 - (2) U.E.R. Médecine-Pharmacie, Université de Rouen Haute-Normandie, rue Thomas-Becket - 76130 Mont-Saint-Aignan.
 - (3) Centre Régional de Transfusion Sanguine, 609, chemin de la Bretèque - 76230 Bois-Guillaume (Directeur : C. Ropartz).
 - (4) Laboratoire de Micro-Infographique, Faculté des Lettres, Université de Rouen Haute-Normandie, rue Thomas-Becket - 76130 Mont-Saint-Aignan.
 - (5) Laboratoire de Biochimie, Hôtel-Dieu, 51, rue de Lecat - 76000 Rouen.

noglobulines sont dénaturées et coagulent sous l'effet de la chaleur [1] et que le pourcentage de la matière protéique soluble par rapport à la matière protéique totale est considérablement augmenté dans le colostrum [3]. Ces faits expliquent que se ressentent, à l'échelon industriel, les variations de composition des fournitures de lait, dues à l'adjonction de colostrum.

La concentration en immunoglobulines G (IgG) dans le colostrum peut atteindre jusqu'à 100 g/l lors de la première traite [11] puis décroît rapidement lors des traites suivantes [5]. Le rapport entre les taux d'IgG du colostrum et du lait peut atteindre des valeurs de 100 à 150 [10]. Les variations de concentration des autres constituants du lait ou du colostrum, considérées tant en valeur relative qu'en valeur absolue, sont de moindre amplitude que celles des IgG. En conséquence, il est logique de choisir d'analyser les variations de concentration de ces protéines pour déterminer si un lait contient ou non du colostrum.

Les fournitures de lait, dans les unités à production diversifiée, devraient faire l'objet d'une orientation vers les différentes fabrications en fonction de leur teneur en matière protéique soluble. Les industriels laitiers sont à la recherche d'une méthode permettant d'évaluer le bilan protéique du lait, dès l'arrivée de ce dernier à l'usine et avec un délai de réponse aussi bref que possible. Il semble bien que la concentration des IgG dans les laits de troupeaux soit un bon marqueur de la quantité de matière protéique soluble (expérimentation en cours).

Il est donc nécessaire de disposer d'une technique de dosage des IgG spécifique, précise, reproductible et, éventuellement, automatisable, pouvant être utilisée sur de grandes séries d'échantillons, d'une part pour déterminer le seuil au-delà duquel la concentration du lait en IgG est le signe de la présence de colostrum et, d'autre part, pour évaluer la relation entre matière protéique soluble et IgG.

Il existe actuellement une technique de dosage des IgG : l'immunodiffusion radiaire simple [14]. Cette technique, bien que spécifique et reproductible, n'est que difficilement adaptable à une utilisation en grande série. Au surplus, le résultat du dosage n'est obtenu qu'après 48 h.

Depuis quelques années, cette technique tend à être progressivement supplantée, pour les dosages protéiques réalisés en grande série (immunoglobulines, transferrine, α -1 antitrypsine, α -2 macroglobuline, composants du complément, etc. [2, 9]) par l'immunonéphélométrie. Cette dernière, également fondée sur le principe de la mesure de la quantité de précipité antigène-anticorps permet des dosages avec un temps de réponse de 30 min.

Le présent mémoire rend compte de l'adaptation de l'immunonéphélométrie au dosage des IgG dans le lait de vache.

MATERIEL ET METHODES

I. Préparation des IgG bovines

Après coagulation du sang de bœuf et rétraction du caillot, 60 ml de sérum sont chromatographiés sur une colonne d'échange d'anions (DEAE-Sephacel : Pharmacia), d (6 cm) × h (25 cm), utilisant un tampon TRIS HCl 0,05 M pH 8,6 contre lequel le sérum a été préalablement dialysé. Les fractions collectées non retenues par la colonne sont détectées à 280 nm, concentrées avec du Carbowax 20 M puis dialysées en tampon NaCl 0,15 M phosphate de sodium 0,01 M. Les solutions protéiques sont analysées soit par électrophorèse en gel d'agar 1,3 p. 100 en tampon véronal-véronal sodique pH 8,4 sur lame microscopique 7,5 × 2,5 cm et sous une d.d.p. 2-4 v/cm pendant 1 h, soit par électrophorèse sur plaque de gel d'acrylamide 7,5 p. 100 en tampon TRIS HCl-glycine, pH 8,9 sous une d.d.p. 15 v/cm pendant 2 h. Les lames sont colorées par le Noir Amido (gel d'agar), ou par le Bleu de Coomassie 2,5 p. 100 (gel d'acrylamide). Les immuno-électrophorèses [16] et les immuno-diffusions (technique d'Ouchterlony [15]), sont réalisées en gel d'agar, 1,3 p. 100 en tampon véronal-véronal sodique pH 8,4 et colorées par le Noir Amido. Les protéines (IgG) sont dosées par la méthode du Biuret ou en utilisant le coefficient

1 p. 100
d'extinction $E = 14$.
280 nm

II. Préparation de l'antisérum anti-IgG (AS-BG) utilisé pour le dosage immunonéphélométrique des IgG

II.1. Un lapin adulte est immunisé dans les coussinets plantaires par 1 mg d'IgG bovines sous un volume total de 0,5 ml d'une émulsion constituée, à parties égales, d'adjuvant de Freund complet et d'une solution aqueuse de NaCl 0,15 M. 20 j plus tard, l'animal est réimmunisé par injection sous-cutanée et intra-musculaire d'une solution contenant 5-7 mg d'IgG en NaCl 0,15 M et adjuvant de Freund incomplet, à parties égales, puis est immunisé régulièrement chaque semaine pendant 4 semaines. Le prélèvement de l'animal est réalisé à la veine marginale de l'oreille. La spécificité de l'immunsérum est contrôlée par immuno-électrophorèse. Le titre de l'immunsérum est mesuré par la technique d'immuno-diffusion radiaire [4]. Le contrôle par immuno-néphélométrie de l'antisérum contre une solution d'IgG bovines étalon permet de fixer un seuil de sensibilité en volts (cf. « résultats »). L'animal est réimmunisé à raison de 5 mg d'IgG par voie intramusculaire et sous-cutanée lorsque les critères de titre déterminés comme ci-dessus sont jugés insuffisants.

II.2. Certaines protéines, présentes dans les préparations destinées à immuniser les animaux, ne sont pas détectables par les méthodes immuno-chimiques classiques, mais peuvent cependant induire la formation d'anticorps chez l'animal immunisé. Les anti-

corps, dirigés contre des protéines sériques bovines autres que les IgG, contenus dans l'immunsérum, sont constitués essentiellement d'anti-albumine. Ils sont absorbés en phase solide après fixation d'albumine bovine sur du Sépharose-4B (Pharmacia) préalablement activé par le Bromure de cyanogène (rapport albumine bovine/Sépharose activé = 100 mg/10 ml). L'absorption de l'immunsérum avec le Sépharose-albumine s'effectue volume à volume à la température du laboratoire pendant 18 h.

II.3. La clarification de l'immunsérum est réalisée après filtration sur un filtre 0,22 μ monté sur une fiole de Buchner. Dans une seconde étape, l'immunsérum est traité par le 1,1,2-Tri-chloro-trifluoroéthane (Fluka). Le mélange est vigoureusement agité pendant 20 à 25 min dans une ampoule à décantation et la phase supérieure est recueillie. L'opération est réalisée en deux fois, de telle façon que le rapport final antisérum/solvant utilisé soit égal à 1. L'antisérum est centrifugé à 5 000 tours par minute pendant 20 min et conservé à -30° C en présence d'azothydrate de sodium (0,1 p. 100).

III. Antisérums commerciaux

Quatre antisérums commerciaux ont été utilisés : 2 anti-IgG (spécificité anti-H + L et anti-sous-classes IgG1 et IgG2), AS-HB (Hoechst Behring) et AS-CL (Cappel laboratories) ; deux antisérums, chacun spécifique d'une des sous-classes d'IgG, anti-IgG1 ou anti-IgG2, ont été utilisés lors de certains contrôles (Miles-Flobio S.A.).

IV. Techniques de dosage des IgG

IV.1. IMMUNO-DIFFUSION RADIAIRE SIMPLE (I.D.R.)

La technique utilisée est celle de Mancini G. *et al.* [12]. La diffusion s'effectue en gel d'agar Noble 2,5 p. 100 ou agarose 1,3 p. 100 en tampon véronal sodique pH 8,6. 5 μ l de chaque échantillon (lactosérum dilué au 1/2) ou 5 μ l de dilutions d'une solution étalon d'IgG bovines 1,390 g/l (constituant la gamme étalon suivante : 1,042 g/l, 0,695 g/l, 0,463 g/l, 0,347 g/l) sont appliqués dans des réservoirs de diamètre : 3 mm et de hauteur : 1 mm, et la diffusion est poursuivie pendant 48 h à température du laboratoire. Les plaques sont ensuite lavées 3 j en NaCl 0,15 M et 1 h en eau distillée, séchées puis colorées par le Bleu de Coomassie R 2,5 p. 100, le diamètre des cercles de précipitation est mesuré au moyen d'un appareil lecteur agrandisseur (Hoechst) et la concentration (mg/ml) en IgG bovines est exprimée en fonction de la surface de l'anneau de précipitation.

IV.2. IMMUNONÉPHÉLOMÉTRIE

Principe : On mesure la lumière dispersée au contact des particules d'immun-complexes formés en zone d'excès d'anticorps. Dans

ces conditions, la quantité de précipité est proportionnelle à la quantité d'antigène ajoutée. Un faisceau lumineux monochromatique (632,8 nm) de grande intensité est émis par un tube plasma laser ; le cône de lumière dispersée est recueilli après focalisation sur un photodétecteur et le signal électrique, mesuré en volts, est directement proportionnel à la quantité d'immun-complexes.

Appareillage : L'appareil utilisé est un laser-néphélomètre (modules I + II) (Behring Werke, Marburg) comportant un passeur d'échantillons et une calculatrice imprimante. Les semi-microcuves ont un trajet optique de 10 mm et sont à usage unique. La calculatrice peut mettre en mémoire les blancs-cuve et les retrancher automatiquement de la valeur de mesure. En méthode manuelle, le résultat est porté sur papier bi-logarithmique ; l'utilisation de la calculatrice permet l'impression directe des valeurs obtenues en mg/100 ml.

Technique : A 20 ml de lait frais ou conservé une nuit à + 4° C, on ajoute quatre gouttes d'une solution de présure au 1/10 000. Après 30-40 min au bain-marie à + 37° C, le lactosérum recueilli est clarifié par passage sur filtre Millipore 0,22 µm monté à l'extrémité d'une seringue. A 10 µl de lactosérum non dilué ou dilué au 1/2 en eau physiologique stérile au moyen d'un distributeur-diluteur automatique Hamilton, on ajoute 200 µl d'immunsérum dilué au 1/5 également comme ci-dessus. Le mélange réactionnel est laissé à incuber 30 min à température du laboratoire. On traite parallèlement six dilutions d'une solution d'IgG bovines à taux précisé (compris entre 1,30-1,40 g/l) réalisant la gamme d'étalonnage suivante : 1,39 g/l-0,695 g/l-0,347 g/l-0,173 g/l- 0,086 g/l-0,043 g/l. Après 30 min d'incubation, le portoir contenant les semi-microcuves est placé sur le passeur d'échantillons du néphélomètre qui enregistre directement la quantité d'IgG du lactosérum à raison de un dosage toutes les 15 s. Le voltmètre enregistrant des valeurs comprises entre 0 et 19,99 volts, toute valeur supérieure à cette dernière sera indiquée clairement par le voltmètre digital (signal « + ») et la bande d'enregistrement « ↑ ».

V. Choix des échantillons

Les laits individuels et les laits de troupeaux ont été collectés pendant le mois de janvier dans les départements de l'Eure et de la Seine-Maritime.

VI. Etude statistique

Cette étude a été réalisée sur un micro-ordinateur HP 9825 (Hewlett-Packard) connecté à une table traçante HP 9872 A (Hewlett-Packard).

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Spécificité et titre de l'immunsérum anti-IgG

I.1. La détermination de spécificité de l'immunsérum utilisé dans ce travail indique que : a) deux immunsérums commerciaux anti-sous-classe IgG1 et anti-sous-classe IgG2 sont chacun en communauté partielle avec cet immunsérum lorsqu'ils sont testés par la technique d'Ouchterlony [16] contre du sérum de bœuf convenablement dilué. b) Après absorption par des IgG2 de sérum de bœuf, isolées par chromatographie, l'immunsérum contient encore des anticorps révélant, par immuno-électrophorèse, les IgG sériques bovines. c) Le diamètre du cercle de précipitation obtenu par immunodiffusion radiaire est identique lorsque la détermination est réalisée avec un même lactosérum dans deux plaques en parallèle, l'une contenant l'antisérum fabriqué au laboratoire, l'autre un anti-IgG1 spécifique. Ces résultats indiquent donc que les spécificités anticorps de l'immunsérum utilisé sont : anti-H (et/ou anti-L), anti-IgG2 et anti-IgG1.

I.2. Le titre des immunsérums utilisés n'est jamais inférieur à 1,5 mg/ml. Parallèlement, la réponse en volts des mêmes lots étudiés dans les conditions expérimentales de dosage des lactosérums est comprise entre 13 et 16 V pour le point supérieur de la courbe d'étalonnage correspondant à 1,39 g IgG/l.

II. Détermination du taux d'IgG dans des laits et des lactosérums correspondants

II.1. DOSAGE DES IgG PAR IMMUNO-DIFFUSION RADIAIRE

Après coloration, deux anneaux de précipitation sont obtenus, soit avec la gamme standard constituée d'IgG pures, soit avec les échantillons testés : lait ou lactosérum. Seul, le diamètre du cercle extérieur est noté. Le rapport des surfaces délimitées respectivement par le diamètre extérieur (SE) et par le diamètre intérieur (SI) étant en pratique constamment voisin de 4 ($\frac{SE}{SI} = 4$), la présence

d'un petit cercle intérieur ne constitue pas une gêne à la détermination du diamètre extérieur. Il faut attribuer la formation d'un deuxième cercle de précipitation, non pas à une protéine sans parenté antigénique avec les IgG bovines, mais au fait que l'immunsérum contient des anticorps dirigés contre les deux sous-classes d'IgG bovines [6] : ainsi, le petit cercle intérieur doit correspondre aux IgG2 qui représentent environ 3 p.100 des IgG totales du lait de vache [8]. Il n'est pas possible de relier quantitativement le rapport des surfaces des deux cercles de précipitation et le rapport

connu entre les concentrations des deux sous-classes d'IgG car les systèmes précipitants responsables de la formation des deux anneaux ont probablement des affinités différentes.

II.2. DOSAGE DES IgG DE LACTOSÉRUM PAR IMMUNO-NÉPHÉLOMÉTRIE

II.2.1. *Turbidité résiduelle des lactosérums*

Quatre lactosérums ont chacun été soumis aux trois modes de clarification suivants :

— précipitation des caséines à la présure suivie d'une filtration sur filtre Millipore de porosité 0,22 μm ;

— précipitation des caséines à la présure puis à pH 4,6 et filtration sur filtre Millipore de porosité 0,22 μm ;

— précipitation des caséines à la présure puis par acidification à pH 4,6, délipidation au trichlorotrifluoroéthane volume à volume et filtration sur filtre Millipore de porosité 0,22 μm .

Des mélanges contenant 200 μl d'un sérum de lapin non immunisé, préparé selon la méthode précédemment indiquée, dilué au 1/5 en NaCl 0,15 M et 10 μl de lactosérum pur ou dilué au 1/2 ou au 1/4 en NaCl 0,15 M, ont été étudiés en néphélogométrie. Quels que soient le lactosérum étudié, son mode de clarification ou sa dilution, la réponse du voltmètre n'excède pas 0,48 v et se trouve dans la zone de voltage obtenue en examinant un mélange réalisé en remplaçant le lactosérum par une solution de NaCl 0,15 M (résultats non présentés). Il peut donc être conclu que les échantillons de lactosérum ne possèdent pas une turbidité résiduelle suffisante pour modifier sensiblement les valeurs obtenues lors des dosages d'IgG.

II.2.2. *Etablissement de la courbe de précipitation. Domaine d'utilisation de l'immunsérum.*

II.2.2.1. La courbe de précipitation de l'antisérum utilisé vis-à-vis de dilutions décroissantes d'IgG bovines est présentée dans la figure 1. A 20 μl de la dilution d'antigène sont ajoutés 80 μl de l'antisérum utilisé à concentration constante. On laisse le précipité antigène/anticorps se former 1 h à 37° C et une nuit à 4° C. Après 10 min de centrifugation, le précipité est lavé deux fois consécutivement avec 500 μl d'eau physiologique tamponnée, repris dans 500 μl d'acide acétique 1 M et la D.O. enregistrée à 280 nm. On peut constater, sur la figure 1, qu'en excès d'anticorps, la quantité de précipité Ag/Ac croît linéairement entre 0,10 g/l et 2,50 g/l d'IgG bovines. La dissolution du précipité apparaît pour les valeurs supérieures à 5 g/l d'IgG.

II.2.2.2. La quantité de précipité Ag/Ac obtenue dans des conditions expérimentales semblables à celles indiquées précédemment, a été mesurée au moyen du néphélogomètre. A chacune des dilutions d'antigène (10 μl) a été ajoutée une concentration constante d'immun-

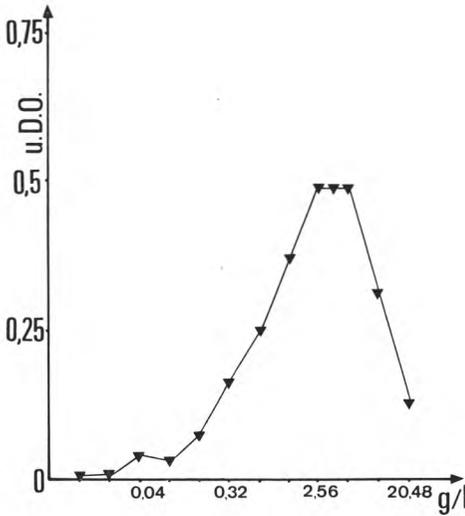


fig. 1

Courbe d'équivalence en tube de l'antisérum utilisé au laboratoire contre une préparation d'IgG purifiées. En abscisse, est portée, sur une échelle logarithmique, la concentration en antigène en g/l et, en ordonnée, la densité optique à 280 nm obtenue après redissolution du précipité antigène-anticorps par l'acide acétique, en unité de densité optique (u.d.o.).

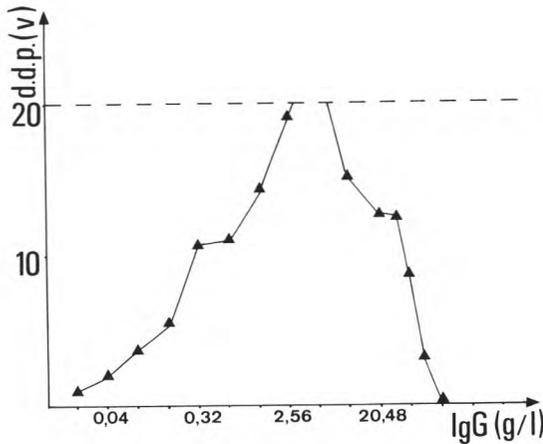


fig. 2

Courbe d'équivalence, au néphélomètre, de l'antisérum utilisé au laboratoire contre une préparation d'IgG purifiées. En abscisse, est portée sur une échelle logarithmique la concentration en antigène en g/l et, en ordonnée, la différence de potentiel mesurée aux bornes du voltmètre de l'appareil, en volts.

sérum (200 μ l d'une solution d'immunsérum dilué au 1/5). L'incubation du mélange a été poursuivie pendant 30 min. La figure 2 indique la réponse en volts de l'appareil en fonction de la quantité d'antigène ajoutée. Dans les conditions expérimentales employées, un seuil de détection convenable en volts est obtenu pour une concentration d'IgG égale à 0,04 g/l, et pour une concentration égale à 1,40 g/l, la réponse en volts avoisine 14-16 v. Pour ces raisons, la gamme d'étalonnage utilisée a été choisie de telle façon qu'elle couvre les

valeurs comprises entre ces concentrations extrêmes. On peut constater, par ailleurs, que les concentrations en g/l d'IgG contenues dans la très grande majorité des lactosérums normaux analysés sont effectivement comprises dans les limites de la gamme d'étalonnage [10]. Le programme de la calculatrice possède un contrôle interne de chaque courbe de référence introduite. Le tableau 1 donne un exemple de trois courbes standard réalisées avec trois antisérums différents : l'antisérum préparé au laboratoire ainsi que deux antisérums commerciaux AS-HB et AS-CL. La machine indique, pour chaque point de gamme la déviation en pourcentage de la valeur absolue par rapport à la courbe théorique idéale. La courbe est considérée comme correcte par l'appareil (test automatique) lorsque aucun des pourcentages n'est supérieur à 10. La courbe réalisée avec l'antisérum AS-HB a été rejetée par la calculatrice qui, dans ce cas, ne calcule pas automatiquement les concentrations en IgG.

TABLEAU 1

Gammes étalon pour l'immunonéphélogrammétrie réalisées avec la même solution standard d'IgG et les antisérums : préparé au laboratoire (Bois-Guillaume) et commerciaux 1 et 2 (AS-HB et AS-CL)

d.d.p. : différence de potentiel enregistrée aux bornes du voltmètre du néphélogrammétre.

p. 100 écart : pourcentage d'écart avec la courbe théorique idéale par rapport à la valeur idéale absolue.

Solution étalon d'IgG bovines		Antisérum					
Dilution	Concentration en IgG (mg/dl)	Bois-Guillaume		AS-HB		AS-CL	
		d.d.p. (v)	p. 100 d'écart	d.d.p. (v)	p. 100 d'écart	d.d.p. (v)	p. 100 d'écart
1/1	139	15,25	— 0,1	16,48	— 9	15,54	— 3,2
1/2	69,5	11,66	0,3	15,84	23,1	14,37	9,5
1/4	34,75	8,74	— 0,1	13,80	— 9,2	11,98	— 5,8
1/8	17,375	6,08	0,2	11,52	— 1,6	8,59	— 0,2
1/16	8,6875	3,37	— 0,5	9,00	0,1	4,95	0
Acceptation de la courbe et calcul automatique des valeurs :		oui		non		oui	

II.2.2.3. La loi expérimentale fondamentale de la précipitation quantitative établit que la formation d'un précipité spécifique n'est possible que dans certains rapports entre les quantités d'antigène et d'anticorps. En zone d'excès d'antigène, le précipité antigène-anticorps se redissout progressivement. La figure 2 permet de considérer les divers aspects de ce phénomène. Toute valeur, exprimée en volts, située soit au-delà du point supérieur de la gamme d'étalonnage (par exemple > 15 v), soit dépassant la capacité d'enregistrement de l'appareil ($> 19,99$ v), correspond à un échantillon qui doit être redilué en raison d'une concentration trop élevée en IgG bovines. Quand l'échantillon est dilué au 1/2, une réponse très faible du voltmètre, en dessous du point le plus bas de la gamme d'étalonnage, correspond à une concentration très élevée en IgG bovines, se situant dans la partie droite de la courbe de la figure 2. Enfin, l'appareil peut déterminer une valeur, comprise entre les bornes de la gamme d'étalonnage, mais qui se localise en réalité dans la partie droite de la courbe. Il sera nécessaire, dans ces deux derniers cas, de réaliser des dilutions plus importantes (du 1/10 au 1/50) pour reproduire les conditions correctes du dosage : ces cas, exceptionnels, correspondraient à des colostrums des premières traites caractérisés, de surcroît, par leur intense coloration jaune due à des taux élevés de caroténoïdes [17].

II.2.2.4. Le pouvoir de définition de la courbe standard, Pd :

$$Pd = \frac{\Delta \text{ d.d.p.}}{\Delta (C)} \quad \text{où } \Delta (C) \text{ est l'intervalle des concentrations mesurables (mg/dl)}$$

et Δ d.d.p. est l'intervalle entre les différences de potentiel extrêmes obtenues (v)

a été étudié en comparaison pour l'antisérum préparé au laboratoire et pour les deux antisérums commerciaux. La figure 3 montre les trois courbes standard obtenues et indique que Pd est maximum pour l'antisérum du laboratoire, AS-BG : $0,103 \text{ v (mg/dl)}^{-1}$ alors qu'il est de $0,069 \text{ v (mg/dl)}^{-1}$ pour AS-HB et de $0,099 \text{ v (mg/dl)}^{-1}$ pour AS-CL.

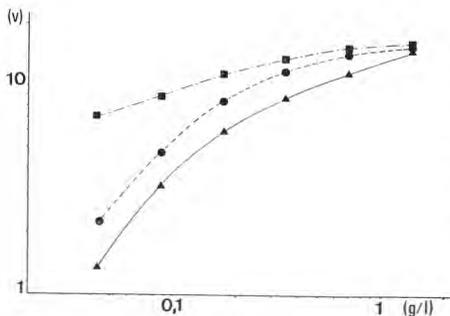


fig. 3

Courbes standard pour l'immuno-néphélométrie, réalisées avec trois antisérums différents : (—▲—) antisérum préparé au laboratoire et (—■—) AS-HB et (—●—) AS-CL du commerce.

En abscisse, est portée, sur une échelle logarithmique, la concentration en antigène, en g/l et, en ordonnée, la différence de potentiel aux bornes du voltmètre de l'appareil, en volts.

II.2.2.5. Pour étudier, dans le temps, le développement du précipité antigène-anticorps : 10 μ l d'une solution d'IgG à 1,40 g/l ont été incubés avec 200 μ l de l'antisérum dilué au 1/5, à la température du laboratoire, et la quantité de précipité Ag/Ac a été mesurée toutes les 5 min au néphélomètre pendant un temps total de 60 min. On peut constater (fig. 4) qu'un plateau est atteint après environ

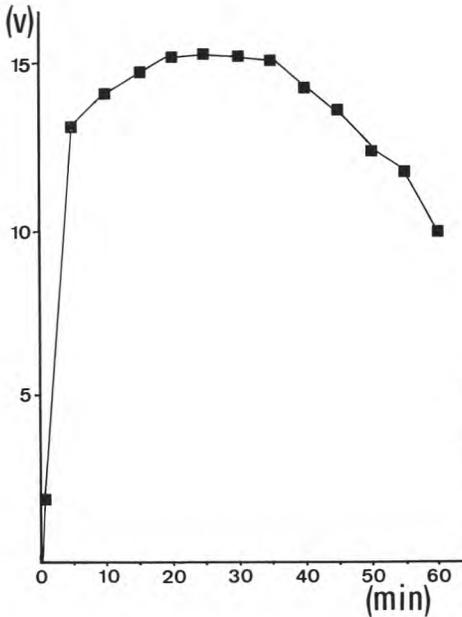


fig. 4

Cinétique de formation du précipité antigène-anticorps dans la cuve de néphélométrie. Cette courbe est obtenue en faisant réagir l'antisérum du laboratoire contre la préparation standard d'IgG (cf. Résultats et Discussion).

En abscisse est porté le temps d'incubation en minutes et, en ordonnée, la différence de potentiel aux bornes de l'appareil, en volts.

15 min et que la stabilité du précipité persiste pendant une vingtaine de minutes. Dans ces conditions, la quantité de précipité Ag/Ac a été déterminée systématiquement après 30 min d'incubation pour tous les dosages réalisés.

II.2.3. Répétabilité et reproduction de la méthode

Cinquante dosages d'IgG ont été réalisés le même jour, sur un même lactosérum. Une moyenne de 62,6 mg/dl, un écart-type de 2,2 mg/dl et un coefficient de variation de 3,5 p. 100 ont été calculés. Pour étudier la reproductibilité de la méthode de jour à jour, trois dilutions croissantes d'un même lactosérum ont été analysées sur une période de 27 j (tab. 2). Un coefficient de variation de 5 p. 100 a été calculé pour les concentrations d'IgG correspondant aux valeurs moyennes (0,594 g/l) des IgG de lactosérum.

TABLEAU 2

Reproductibilité du dosage des IgG de trois dilutions d'un lactosérum

* Cette valeur indique que 19 valeurs dépassaient le voltage le plus élevé de la courbe étalon et n'ont pu être calculées.

§ La moyenne obtenue pour la concentration en IgG est sous-estimée.

	Dilution de l'échantillon	Nombre de mesures	Moyenne	Ecart type	Coefficient de variation (p. 100)
Voltage (V)	1/1	27	15,04	0,32	2
	1/2	27	11,46	0,47	4
	1/4	27	8,31	0,65	8
Concentration (mg/dl)	1/1	8*	132,3§	7,3	6
	1/2	27	59,4	3,0	5
	1/4	27	28,8	1,3	4

Il est à noter que les valeurs obtenues pour le lactosérum non dilué ne sont pas entièrement cohérentes avec celles calculées à partir des dilutions au 1/2 ou au 1/4. Ce fait n'a pas, à l'heure actuelle, reçu d'explication satisfaisante. Il ne s'agit pas d'un phénomène lié à la turbidité résiduelle du lactosérum (voir chapitre II.2.1.). Il est possible que le modèle mathématique d'ajustement de la courbe étalon puisse être moins adéquat pour les valeurs situées aux extrémités de la gamme, fait déjà signalé par d'autres auteurs [2] lors d'études précédentes.

III. Comparaison des résultats du dosage des IgG par immunonéphélométrie et par immunodiffusion radiaire simple

Les IgG de lactosérums provenant de 303 laits individuels et de 70 laits de troupeaux ont été dosées parallèlement à l'aide des deux techniques. La figure 5 montre le nuage obtenu en traçant les points ayant pour abscisse (x) la concentration en IgG mesurée par immunonéphélométrie et en ordonnée (y) par immunodiffusion radiaire simple. La droite de régression de y en x a pour équation :

$$y = 1,28x + 0,16 \quad \left\{ \begin{array}{l} y = \text{concentration en IgG mesurée par immunodiffusion radiaire simple} \\ x = \text{concentration en IgG mesurée par immunonéphélométrie.} \end{array} \right.$$

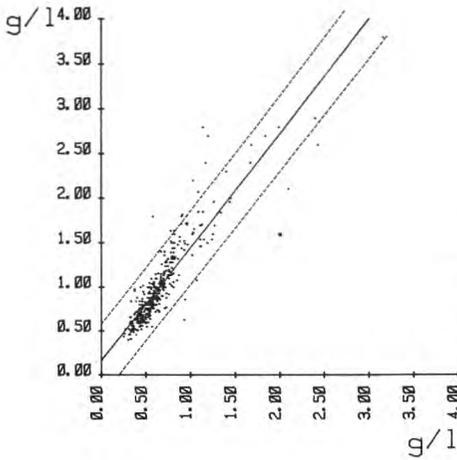


fig. 5

Régression linéaire du taux des IgG mesuré par immunodiffusion radiaire et taux des IgG mesuré par immunonéphélométrie. Les droites pointillées sont les approximations linéaires des hyperboles délimitant l'intervalle de confiance à 5 p. 100. Les équations de ces droites ainsi que de la droite de régression sont indiquées dans le texte.

Le coefficient de corrélation linéaire calculé pour cette droite est : $r = 0,90$.

Les droites d'approximation des hyperboles délimitant l'intervalle de confiance à 5 p. 100 ont pour équation :

Droite supérieure : $y = 1,28x + 0,58$.

Droite inférieure : $y = 1,28x - 0,25$.

L'immunodiffusion radiaire simple fait donc apparaître des concentrations plus élevées que l'immunonéphélométrie (moyenne (IDR) = 1,01 g/l ; moyenne (IN) = 0,66 g/l).

Bokhout [6, 7] a dosé par immuno-diffusion radiaire simple les IgG sériques bovines, en réalité constituées des sous-classes IgG1 et IgG2, au moyen d'immunsérums de spécificité variée. Cet auteur a constaté que l'utilisation d'immunsérums polyspécifiques anti-classe et anti-sous-classes aboutit à des valeurs pouvant atteindre le double de celles obtenues soit avec un immunsérum uniquement anti-classe soit en faisant la somme des concentrations de chacune des sous-classes mesurées à l'aide de leur immunsérum respectif.

Les antisérums commerciaux anti-sous-classe que nous avons testés produisent avec les IgG bovines du lactosérum des cercles de précipitation de faible intensité en gel et ne forment pas, en milieu liquide, un complexe précipitant, mesurable par la technique immunonéphélométrique. En conséquence, la puissance insuffisante des antisérums monospécifiques de sous-classes ne nous a pas permis de contrôler si ces phénomènes, observés par Bokhout, se produisaient ou non lorsque le dosage des IgG était réalisé en milieu liquide. En l'absence d'arguments contraires, l'explication des taux d'IgG systématiquement plus bas en immunonéphélométrie par rapport à l'IDR pourrait consister en l'absence, en milieu liquide, des phénomènes

liés à la diversité des populations d'antigènes et d'anticorps qui se produisent dans les réactions en milieu gélifié. D'autre part, il semble fréquent que les valeurs obtenues en immunonéphélométrie soient plus hautes ou plus basses que celles trouvées par IDR, ceci dépendant de la protéine dosée, du standard de référence et de l'antisérum utilisé. Pour une même protéine, le sens de cette divergence peut se trouver inversé dans les résultats de travaux différents selon les réactifs employés [2, 9]. Les chiffres annoncés dans ce mémoire ne sont en conséquence valables que pour le standard de référence et l'antisérum utilisé.

Le mode de préparation du matériel protéique utilisé pour la fabrication de l'antisérum utilisé dans notre laboratoire, à savoir la chromatographie du sérum de bœuf par échange d'anions à pH élevé (pH 8,6), permet l'obtention des IgG de mobilité la plus cathodique en électrophorèse en gel d'agar ou d'acrylamide à pH alcalin. Il s'agit essentiellement d'IgG2 comportant des traces d'IgG1 identifiées par immunoelectrophorèse. Dans ces conditions, et selon les critères de pureté immuno-chimiques classiques, il n'est pas mis en évidence d'autres protéines sériques. Un tel mode de préparation des IgG bovines facilite la préparation de l'antisérum en limitant l'absorption ultérieure d'anticorps indésirables non anti-IgG ; à celle des anticorps anti-albumine. En effet, cette protéine est présente à des concentrations de l'ordre de 50 g/l dans le sérum sanguin et se trouve presque toujours à l'état de traces, indétectables par les techniques immuno-chimiques classiques, dans les préparations d'autres protéines sériques. La sérum-albumine étant fortement immunogène, des traces de cette protéine, dans les préparations d'immunoglobulines purifiées, peuvent être responsables de la formation d'anticorps indésirables.

La recherche systématique d'une activité anticorps anti-sous-classe IgG1, immunoglobulines qui représentent plus de 95 p.100 des IgG du lait [8], n'est pas indispensable en raison du fait que les anticorps présents dans l'immunsérum comprennent obligatoirement des anticorps anti-chaîne lourde d'IgG (anti-H) communs aux IgG1 et IgG2. En outre, la sélection d'anticorps anti-sous-classe IgG1 serait susceptible d'entraîner des erreurs dans le dosage lui-même puisque le contenu précis en IgG1 et IgG2 des immunoglobulines constituant la gamme d'étalonnage ne peut être aisément connu avec précision.

CONCLUSION

L'immuno-néphélométrie, adaptée au dosage des IgG bovines dans le lait, est une technique spécifique, précise, reproductible, simple et facilement automatisable.

La mesure de la concentration en IgG bovines dans un mélange d'antigènes (IgG1 + IgG2) avec un antisérum dirigé contre les déterminants antigéniques de classe et de sous-classes, lui-même facile à fabriquer, donne, par cette technique, des valeurs probablement

plus proches de la réalité que l'immunodiffusion radiaire simple dans les mêmes conditions. L'immuno-néphélométrie semble éviter une surévaluation des résultats, par ailleurs inexpliquée, due au milieu gélifié.

Le temps de réponse de l'immuno-néphélométrie est court : 30 min.

Moyennant l'amélioration des procédés de clarification des échantillons qui demeure, en l'état actuel des choses, coûteuse et difficilement automatisable, l'immuno-néphélométrie représentera la technique de choix pour le dosage des IgG bovines sur de grandes séries d'échantillons de lait.

Remerciements

Nous tenons à remercier le Laboratoire Interprofessionnel du lait de Haute-Normandie qui nous a fourni les échantillons de lait et M. Tailleux A., appartenant à cet organisme, pour son excellente assistance technique.

Ce travail a été financé par le contrat D.G.R.S.T., n° 81 J 0125.

N.B. : Ce travail a été présenté, en partie, au Symposium Emil V. Behring « Les Journées Internationales de néphélométrie », Paris, 21-22 novembre 1980.

Résumé

Le dosage des IgG bovines, dans le lait, par immuno-néphélométrie, a été mis au point. Les caractéristiques de l'immunsérum : spécificité, titre, ont été établies et les conditions de son application à l'immuno-néphélométrie ont été déterminées. La répétabilité, la reproductibilité, le temps optimum de réponse et le domaine d'application de cette technique ont été étudiés. Une comparaison avec l'immunodiffusion radiaire simple a été entreprise : l'immuno-néphélométrie apparaît plus fiable, plus précise, donne des réponses dans un délai bref, 30 min, et à un rythme élevé, un résultat toutes les 15 s. Les valeurs obtenues par immuno-néphélométrie sont plus basses que celles obtenues par immunodiffusion radiaire et l'interprétation de cette discordance est discutée.

Summary

IMMUNONEPHELOMETRIC ASSAY OF IMMUNOGLOBULINS G IN COW MILK: I. TECHNICAL ASPECTS

This paper describes a new assay of bovine IgG in cow milk using immunonephelometry. Specificity, titer and conditions of use of the anti-bovine IgG immune serum were characterized. Repeatability, reproducibility, kinetic aspects of the response and limits of use of the assay were studied in details. Results of immunonephelometry were compared with those of radial immunodiffusion: immunonephelometry appears to be more reproducible and precise ; this method gives rapid (30 min) and high rhythm (one per 15 s) res-

ponses; the values obtained by immunonephelometry are lower than those obtained by radial immunodiffusion and the causes of this discrepancy are discussed.

Bibliographie

- [1] ALAIS (Ch.) (1974). — In « Science du lait », SEP éditions, 3^e édition.
- [2] ALEXANDER (R. L.) (1980). — Comparison of radial immunodiffusion and laser nephelometry for quantitating some serum proteins. *Clin. Chem.*, 26, 314-317.
- [3] ASCHAFFENBURG (P.) (1959). — Quantitative analysis of milk proteins. Meeting de Jouy-en-Josas, 19-22 oct. 1959.
- [4] BECKER (W.) (1969). — Determination of antisera titres using the simple radial immunodiffusion method. *Immunochemistry*, 6, 539-546.
- [5] BHATIA (K. L.) and GANGULI (N. C.) (1977). — Post-partum changes in the immunoglobulin levels in milk of zebu and cross-bred cows. *Indian J. Dairy Sci.*, 30, 82-84.
- [6] BOKHOUT (B. A.) (1975). — Divergent results in radial immunodiffusion with antisera differing in precipitation properties with respect to individual immunoglobulin subclasses. I. The antigen factor. II. The antiserum factor. *J. Immunol. Meth.*, 7, 187-210.
- [7] BOKHOUT (B. A.) and VAN-ASTEN NORDIJK (J. J. L.) (1979). — Divergent results in radial immunodiffusion. III. Isolation and specificity test of class specific antibodies. *J. Immunol. Meth.*, 27, 101-109.
- [8] BUTLER (J. E.) (1971). — Review of the Bovine immunoglobulins. *J. Dairy Sci.*, 54, 1315.
- [9] DITO (W. R.) (1979). — Rapid immunonephelometric quantitation of eleven serum proteins by centrifugal fast analyser. *Am. J. Clin. Pathol.*, 71, 301-308.
- [10] JOISEL (F.), LANNUZEL (B.), LEBRETON (J. P.), BOUTLEUX (S.) et SAUGER (F.) (1981). — Dosage immunonéphélométrique des immunoglobulines G du lait de vache. II. Application à la détection de la présence de colostrum dans les laits de mélange (à paraître).
- [11] LEVIEUX (D.) (1978). — Evolution des immunoglobulines G1 du lait de vache au cours des 4 premiers mois de lactation : mesure dans neuf étables du Puy-de-Dôme. *Bull. Techn. C.R.Z.V., Theix-I.N.R.A.*, 33, 47-52.
- [12] MANCINI (G.), CARBONARA (A. O.) and HEREMANS (J. M.) (1965). — Immunological quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2, 235.
- [13] MAURICE (L.) (1979). — Mémoire pour le titre d'Ingénieur de l'Ecole Supérieure des Ingénieurs et Techniciens en Alimentation. Le Vaudreuil - F. 27100 (France).
- [14] NEWSTEAD (D. F.) and ORMSBY (J. E.) (1970). — A new test for the detection of colostrum in herd milk. *New Zealand J. Dairy Sci. Techn.*, 5, 52-56.
- [15] OUCHTERLONY (O.) (1962). — Diffusion in gel for immunological analysis II. *Prog. Allergy*, 6, 30.
- [16] SCHEIDEGGER (J. J.) (1955). — Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7, 103.
- [17] THOMPSON (S. Y.) and Mc GILLIVRAY (W. A.) (1957). — Factors influencing the vitamin content of milk fat. V. Changes in vitamin A and carotenoid content of the blood plasma of cows and heifers near parturition in relation to secretion of these substances in the milk fat. *J. of Dairy Res.*, 1957, 24, 108.