

Couplage d'un stéroïde à la phosphatase alcaline pour la réalisation de dosages immunoenzymatiques par compétition dans le plasma sanguin de différentes espèces de mammifères domestiques

Corinne Laclie¹
Dominique Gennetay¹
Mailys Gaudet¹
Anne-Lyse Lainé¹

Correspondance
corinne.laclie@inrae.fr

Résumé.

Les concentrations de divers stéroïdes impliqués dans la reproduction et les comportements des animaux, notamment la progestérone, sont mesurées par dosages au sein du laboratoire Phénotypage Endocrinologie. La progestérone ayant un rôle primordial dans la reproduction chez la femelle, sa concentration dans le plasma sanguin est mesurée par dosage immunoenzymatique par compétition. À l'arrêt de la commercialisation de la progestérone couplée à la phosphatase alcaline (P4-Pal), réactif essentiel à ce dosage par compétition, nous avons décidé de mettre au point un protocole de couplage de stéroïdes à la phosphatase alcaline. Suite à la réalisation de ce couplage pour la progestérone, et dans le cadre de la démarche qualité du laboratoire, la fiabilité, la répétabilité et la reproductibilité des résultats obtenus ont été évaluées. Tous ces critères de qualité étant satisfaisants, nous avons étudié les corrélations existant entre les concentrations obtenues dans des échantillons plasmatiques par dosages utilisant la P4-Pal produite au laboratoire et celles obtenues avec la P4-Pal initialement commercialisée. Pour les 5 espèces animales étudiées majoritairement au laboratoire, les coefficients de corrélation r variaient entre 0,92 et 0,98. Le protocole de couplage de la progestérone à la phosphatase alcaline est aujourd'hui validé.

Mots-clés

Stéroïdes, progestérone, EIA, phosphatase alcaline, reproduction, hormone.

¹ CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Laboratoire Phénotypage Endocrinologie, F-37380, NOUZILLY, France.

Coupling steroids with alkaline phosphatase for competitive immunoenzymatic assays in the plasma of various domestic mammals

Corinne Laclie¹
Dominique Gennetay¹
Mailys Gaudet¹
Anne-Lyse Lainé¹

Correspondence
corinne.laclie@inrae.fr

Abstract

The concentrations of various steroids involved in animal reproduction and behavior, in particular progesterone, are analyzed by assays in the Endocrinology and Phenotyping Laboratory. Since progesterone is known to play a major role in reproduction in females, its concentration in plasma is analyzed by competitive immuno-enzymatic assay. With the halting of the sale of progesterone coupled with alkaline phosphatase (P4-Pal), the reactant essential for this competitive assay, we decided to develop a protocol for coupling steroids with alkaline phosphatase. Following this coupling for progesterone, and in the framework of the laboratory's quality approach, the reliability, repeatability and reproducibility of the results were assessed. Since all these quality standards were satisfactorily met, we looked for the existence of correlations between the concentrations obtained in plasma samples with assays using the P4-Pal produced in the laboratory and those obtained using the P4-Pal initially marketed. For the 5 animal species studied mostly in the laboratory, the correlation coefficients r varied between 0.92 and 0.98. The protocol for coupling progesterone with alkaline phosphatase has been validated.

Keywords

Steroids, progesteron, EIA, alkaline phosphatase, reproduction, hormone.

¹ CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Laboratoire Phénotypage Endocrinologie, F-37380, NOUZILLY, France.

Introduction

Le laboratoire de Phénotypage Endocrinologie de l'UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements (INRAE Tours Nouzilly) a pour mission de réaliser des dosages d'hormones impliquées dans l'évaluation ou le contrôle de la reproduction et des comportements chez les mammifères et les volailles, mais aussi le développement méthodologique de nouveaux dosages.

La progestérone, qui a un rôle essentiel dans la fonction de reproduction chez les femelles (Driancourt MA et al, 2014), est un des stéroïdes dont la concentration est mesurée par dosage immunoenzymatique au laboratoire. Du fait de la faible masse moléculaire des stéroïdes, seules des méthodes d'immunos dosage dites par compétition sont possibles. En 2008, une méthode immunoenzymatique (EIA) pour le dosage de la progestérone (P4) dans le plasma ovin et bovin (Canépa et al, 2008) a été mise au point et validée au laboratoire. Elle consiste à mettre la progestérone de l'échantillon en compétition, pour se lier à un anticorps, avec de la progestérone couplée à une enzyme dont l'activité est facilement mesurable. Dans le cadre du dosage de progestérone, cette compétition est effectuée avec la progestérone couplée à la phosphatase alcaline commercialisée par Immunometrics London.

À l'arrêt de la commercialisation de cette molécule couplée, nous avons décidé de mettre en oeuvre au laboratoire le couplage de la progestérone à la phosphatase alcaline. Après une recherche bibliographique, nous nous sommes appuyés sur les travaux de AM. Sesay (Sesay et al, 2013) concernant le couplage du cortisol à la phosphatase alcaline, ce réactif étant utilisé ensuite pour le dosage du cortisol dans la salive humaine, pour adapter ce protocole à la progestérone et à son dosage dans le plasma de différentes espèces d'animaux de rente.

Cet article rend compte de ce protocole de couplage et de ses différentes étapes de validation, dans le cadre de l'utilisation de cette molécule couplée à la réalisation des dosages immunoenzymatiques de progestérone.

Matériel et méthodes

Il s'agit de coupler la progestérone (4-PREGNEN-3,20-DIONE-3-O-CARBOXYMETHYLOXIME) (progestérone-3-CMO) (Steraloids, Q2605) ou (Sigma, P3277) à la phosphatase alcaline.

Les réactifs et tampons

- La Phosphatase alcaline (Biorad-0300-1706) est utilisée pour réaliser le couplage de stéroïdes.

- L'EDC (N-(3-Diméthylaminopropyl) -N'-éthylcarbodiimide hydrochloride) (SIGMA, E7750) et le NHS (N-Hydroxysuccinimide) (SIGMA, 130672) sont indispensables à l'étape de couplage. La dialyse est réalisée avec les cassettes Slide-A-Lyser Dialysis 10kd 0.5-3 ml (UGAP, 66380).
- Le tampon de dialyse est un tampon 100mM Tris (MP Biomedicals, LLC, 819623), 150mM NaCl (VWR Pro-labo, 27810295), 2mM MgCl₂ (Sigma, M2670), pH 7,5.
- Le tampon de «coating» est un tampon 50mM carbonate/bicarbonate pH 9,6.
- Le tampon de lavage est un tampon 25mM Tris, 37,5mM NaCl, 0,5mM MgCl₂, pH 7,5, 0,05 % v/v Tween (Sigma P7949).
- Le tampon de saturation et de dilution est un tampon 100mM Tris, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, 5g/l d'albumine bovine (BSA) (Sigma, A3803), pH 7.5.

Couplage de la progestérone à la phosphatase alcaline

Principe

Le but du couplage est de lier une molécule de progestérone-3-CMO avec une enzyme, la phosphatase alcaline, afin de créer une molécule marquée qui est révélée par le substrat de l'enzyme couplée. Comme le montre la figure 1, le couplage s'effectue en plusieurs étapes.

Dans un premier temps, la progestérone-3-CMO vient se coupler avec le N-hydroxysuccinimide (NHS) et le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC). La progestérone-3-CMO NHS active ester est créée ainsi que du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbamide (EDC-Urée). Cette progestérone modifiée est ensuite mise en

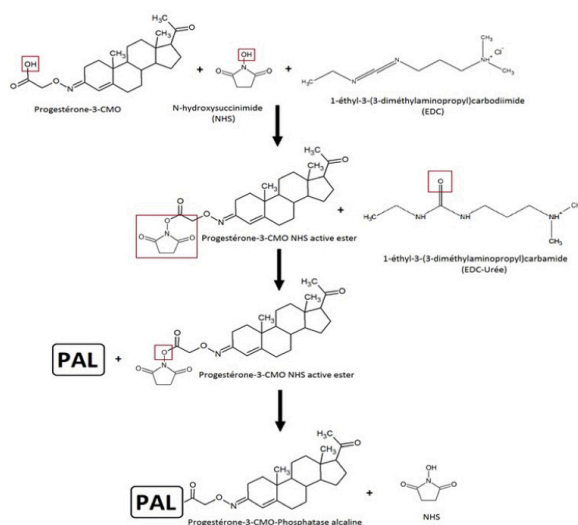


Figure 1. Couplage de la progestérone à la phosphatase alcaline : différentes étapes du couplage chimique.

contact avec la phosphatase alcaline ; la liaison entre le NHS et le reste de la molécule cède tandis que la phosphatase alcaline établit à son tour une liaison covalente avec la progestérone. La progestérone-3-CMO-phosphatase alcaline est ainsi créée. Une dialyse est effectuée afin d'éliminer les résidus de la réaction et la progestérone non couplée. La principale différence de notre protocole par rapport à la référence bibliographique est le tampon de dialyse. Le tampon PBS est remplacé par du tampon Tris, afin que la progestérone couplée à la phosphatase alcaline soit dans le même tampon que celui utilisé lors des dosages immunoenzymatiques de progestérone.

Protocole de couplage

Jour 1

- Peser 16 mg d'EDC dans un microtube et dissoudre avec 100 μ l d'éthanol absolu.
- Calculer le volume V1 de cette solution pour avoir **15 mg** d'EDC.
- Peser 16 mg de NHS dans un microtube et dissoudre avec 60 μ l d'éthanol absolu.
- Calculer le volume V2 de cette solution pour avoir **15 mg** de NHS.
- Dissoudre 10 mg de progestérone avec V3 μ l d'éthanol absolu puis V1 μ l de la solution d'EDC et enfin V2 μ l de la solution de NHS afin d'obtenir un volume total de **250 μ l**.
- Le flacon contenant le mélange réactionnel (progestérone, EDC et NHS) est agité avec l'agitateur vibrant (IKA yellowline) à 1 500 tr/min pendant 30 s, puis il est mis sous agitation (agitateur orbital Heidolph Titramax 1000) à 750 tr/min pendant 1 h, à température ambiante et dans l'obscurité.
- Après l'heure d'incubation du mélange réactionnel, 1 ml de la solution de phosphatase alcaline à 1 mg/ml diluée avec du tampon de dialyse est ajouté. Il est important d'utiliser la phosphatase alcaline les jours suivant sa réception pour limiter sa dégradation. Non couplée et après décongélation, elle se conserve environ 5 jours à 4 °C et dans l'obscurité.
- Le flacon est mis sous agitation (agitateur orbital Heidolph Titramax 1000) à 750 tr/min pendant une nuit à 4 °C et dans l'obscurité.

Jour 2

- Après centrifugation du flacon (microcentrifugeuse de paillasse), la solution est injectée dans une cassette de dialyse Slide-A-Lyser Dialysis 10kd.
- La cassette est incubée dans 500ml de solution de dialyse, sous agitation douce avec un barreau aimanté pendant 2 h, à 4 °C dans l'obscurité.

- Le bain de dialyse est alors changé une 1ère fois puis remis dans les mêmes conditions et une 2nde fois avec un temps d'incubation au minimum de 3 h 30.
- Le contenu de la cassette (environ 1,5 ml) est alors récupéré et mis dans un microtube brun.
- Après agitation douce (IKA yellowline), et afin d'éviter trop de variations thermiques à l'utilisation, il est important de faire des aliquots de 200 μ l environ et de les conserver à 4 °C, à l'abri de la lumière.

Dosage de la progestérone

Principe

La progestérone (P4) est dosée par méthode immunoenzymatique (EIA), comme décrit précédemment (Canépa S, 2008) (Figure 2).

Les anticorps (Ac) de capture sont des Immunoglobulines G (IgG) de chèvre anti-IgG de souris. Ils sont apportés en excès et se fixent sur la phase solide. Les Ac non fixés sont éliminés par lavage.

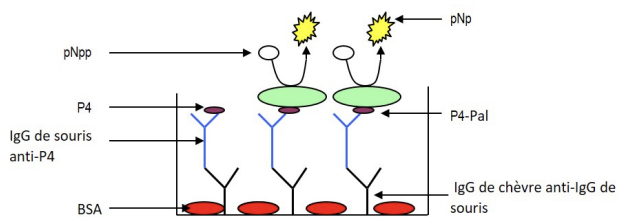


Figure 2. Principe du dosage de la progestérone.

L'Albumine de Sérum Bovin (BSA) est ajoutée pour saturer les puits et éviter toute fixation non spécifique de protéines. L'Ac anti-P4 est mis dans les puits, reconnu par l'Ac de capture, il y a ainsi création d'un complexe.

L'échantillon à doser est ajouté à ce milieu réactionnel : s'il y a présence de P4 dans l'échantillon il y a formation d'un complexe Ag-Ac.

La P4 couplée à la phosphatase alcaline (P4-Pal) est à son tour ajoutée. Il y a alors compétition entre la P4 de l'échantillon et la P4-Pal. Des lavages sont réalisés pour éliminer les protéines et hormones non fixées.

L'activité de la P4-Pal fixée sur la phase solide est mise en évidence par le p-nitrophényl phosphate (pNpp). Ce substrat est hydrolysé par la phosphatase alcaline en p-nitrophényl (pNp) donnant une coloration jaune mesurable par spectrométrie à 405 nm.

L'absorbance obtenue est inversement proportionnelle à la quantité de P4 présente dans l'échantillon. La concentration en P4 de l'échantillon est calculée à partir des absorbances d'une gamme étalon.

Des échantillons contrôles sont insérés à chaque dosage afin de s'assurer de la répétabilité intra-dosage, et de la reproductibilité inter-dosage. La répétabilité correspond aux mesures réalisées dans les mêmes conditions, et la reproductibilité aux mesures réalisées dans des conditions différentes (jour différent, manipulateur différent, etc.).

Préparation des gammes étalons et des échantillons contrôles de progestérone

Les gammes étalons sont préparées en supplémentant un plasma « zéro » (initialement dépourvu de progestérone) avec de la progestérone (Steraloid-Q2600) de 0,25 à 32 ng/ml. Une gamme étalon est préparée pour chaque espèce animale étudiée. Elle est intégrée dans chaque dosage afin de pouvoir déterminer les concentrations des échantillons dosés.

Les échantillons contrôles sont préparés sur le même principe. En général, 2 à 3 échantillons contrôles (valeur basse, intermédiaire et haute) par espèce animale sont inclus dans chaque dosage afin de s'assurer de la répétabilité intra-dosage et de la reproductibilité inter-dosage. Ils permettent de valider la précision du dosage effectué.

Les méthodes de calcul

La concentration en P4 des points de gamme étalon est représentée graphiquement en fonction du pourcentage de liaison de la P4-Pal à l'anticorps anti-P4 (% B/B0). Ce pourcentage est le rapport de la densité optique (DO) à 405 nm du point de gamme sur la DO du point 0 de la gamme, multiplié par 100.

Le calcul des concentrations des échantillons est effectué par le logiciel Magellan (TECAN) sur un modèle de régression logistique à 4 paramètres.

Afin de compenser l'effet de l'effectif sur la valeur de l'écart-type, le SEM (erreur standard de la moyenne) est calculé en divisant l'écart-type par la racine carrée de l'effectif.

Validation de l'utilisation de la progestérone couplée à la phosphatase alcaline produite par le laboratoire

Dans cette seconde partie, nous allons vous présenter les différentes étapes de validation de l'utilisation de la progestérone couplée à la phosphatase alcaline produite par le laboratoire, pour la réalisation du dosage de progestérone. Nous avons également étudié la corrélation existante entre les résultats obtenus lors de dosages utilisant la P4-Pal produite au laboratoire et ceux obtenus en utilisant la P4-Pal commercialisée.

Gamme étalon de progestérone

Après avoir effectué le couplage de la progestérone-CMO à la phosphatase alcaline, un dosage de progestérone a été réalisé afin de contrôler la qualité du couplage. La progestérone-CMO couplée à la phosphatase alcaline produite au laboratoire est appelée P4-Pal labo, et celle commercialisée est notée P4-Pal JM. La figure 3 présente les résultats des gammes étalons de progestérone obtenus lors d'un dosage dans l'espèce bovine, utilisant la P4-Pal labo ou la P4-Pal JM.

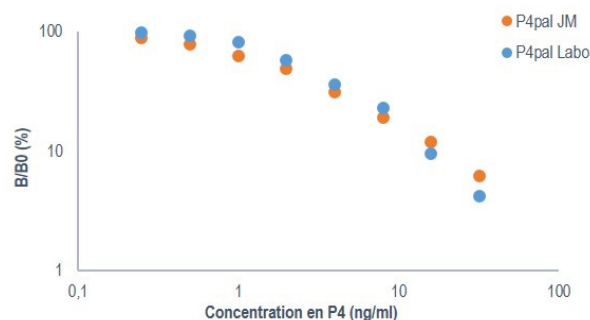


Figure 3. Pourcentage de liaison B/Bo en fonction de la concentration en progestérone de la gamme en plasma bovin selon la P4-Pal utilisée.

Dans un premier temps nous avons pu observer un signal, ce qui a permis d'affirmer que la phosphatase alcaline s'était bien liée à la P4-CMO.

Dans un second temps, le profil des 2 courbes étaient très proches et quasiment superposables, ce qui nous a permis d'utiliser cette P4-Pal labo pour réaliser des dosages d'échantillons.

Valeur des échantillons contrôles

Afin de s'assurer de la fiabilité des résultats, des échantillons contrôles ont été déposés en duplicats ou quadruplicats sur chacune des plaques d'un dosage. Le tableau 1 montre les résultats obtenus lors d'un dosage avec l'utilisation de la P4-Pal labo ou la P4-Pal JM.

Les échantillons contrôles 1 et 2 avaient des concentrations moyennes respectives de 0,9 ng/ml et 1,3 ng/ml quelle que soit la P4-Pal utilisée. Pour l'échantillon contrôle 3, nous avons trouvé une concentration de 1,7 ng/ml avec

Tableau 1 : Valeurs des échantillons contrôles 1, 2 et 3 suivant la P4-Pal utilisée

	Révélation avec P4-Pal JM		Révélation avec P4-Pal Labo	
	Concentration P4 (ng/ml)	Valeur moyenne (ng/ml)	Concentration P4 (ng/ml)	Valeur moyenne (ng/ml)
Contrôle 1	1,0	0,9	1,0	0,9
	0,8		0,9	
Contrôle 2	1,3	1,3	1,3	1,3
	1,3		1,3	
Contrôle 3	1,8	1,6	1,7	1,7
	1,5		1,6	

l'utilisation de la P4-Pal labo contre 1,6 ng/ml avec la P4-Pal JM. Ces valeurs restent très proches. Ainsi pour les deux P4-Pal utilisées lors des dosages, les résultats sont fiables, car les valeurs des échantillons contrôles sont identiques. Pour la suite des expérimentations, seul l'échantillon contrôle 2 sera utilisé.

Répétabilité et reproductibilité

Dans le cadre de la démarche qualité du laboratoire, nous avons évalué les critères de répétabilité et de reproductibilité des dosages.

La répétabilité est mesurée en déposant l'échantillon contrôle 2 sur les différentes plaques lors d'un même dosage. Nous avons observé que, pour les 2 P4-Pal utilisées, la moyenne des concentrations intra-dosage de l'échantillon contrôle 2 est de 1,2 ng/ml avec un SEM de 1,2 % pour la P4-Pal JM, et un SEM de 2,9 % pour la P4-Pal labo (tableau 2).

Tableau 2 : Résultats de répétabilité et reproductibilité obtenus avec les 2 P4-Pal

		P4-Pal JM	P4-Pal Labo
Intra-dosage	Nombre de plaques	8	4
	Nombre d'échantillons du contrôle 2	32	16
	P4 ng/ml intra-dosage	1,2	1,2
	SEM intra dosage (%)	1,2	2,9
Inter-dosage	Nombre de dosages	12	8
	Nombre d'échantillons du contrôle 2	48	37
	Nombre de plaques par dosage	1	1 à 4
	P4 ng/ml inter-dosage	1,3	1,3
	SEM inter dosage (%)	1,8	3,8

La reproductibilité est mesurée en déposant l'échantillon contrôle 2 sur les plaques lors de différents dosages. Le nombre de plaques par dosage est de 1 en utilisant la P4-Pal JM et de 1 à 4 pour la P4-Pal labo. Nous avons observé que pour les 2 P4-Pal utilisées la moyenne des concentrations inter-dosage de l'échantillon contrôle 2 est de 1,3 ng/ml, avec un SEM de 1,8 % pour la P4-Pal JM, et un SEM de 3,8 % pour la P4-Pal labo (tableau 2).

Ainsi, au regard de ces résultats, nous avons obtenu des critères satisfaisants ($SEM < 5\%$ dans tous les cas) de répétabilité et de reproductibilité pour la P4-Pal labo et similaires à ceux obtenus avec la P4-Pal JM.

Corrélation des résultats obtenus lors des dosages utilisant la P4-Pal Labo et la P4-Pal JM

Une corrélation des résultats utilisant les 2 P4-Pal a été étudiée dans l'espèce bovine sur 34 vaches et 400 prélèvements.

La figure 4 illustre la relation existant entre les concentrations de P4 trouvées en utilisant la P4-Pal labo et les concentrations de P4 trouvées en utilisant la P4-Pal JM. Le coefficient de corrélation r est de 0,94.

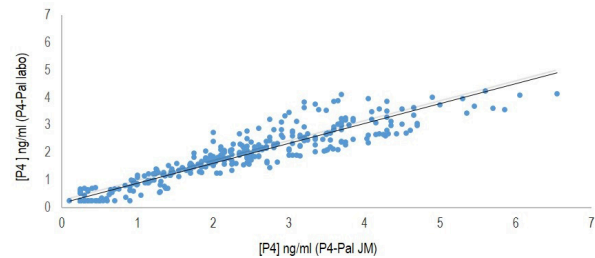


Figure 4. Corrélation P4-Pal Labo / P4-Pal JM pour le dosage de progestérone plasmatique bovin

Ce coefficient étant proche de 1, cela signifie que les résultats obtenus avec les 2 P4-Pal utilisées sont fortement corrélés. Les résultats obtenus en utilisant de la P4-Pal labo sont comparables à ceux obtenus antérieurement en utilisant la P4-Pal JM.

Sur la figure 5, nous pouvons voir le suivi, au cours de deux cycles œstriens, des concentrations plasmatiques de progestérone de deux vaches avec 22 points de prélèvements pour chacune. Nous observons que les profils obtenus avec les 2 P4-Pal sont très proches pour chaque vache. Comme montré lors de la corrélation P4-Pal labo/P4-Pal JM, ces courbes confirment de la similarité des résultats obtenus avec les 2 P4-Pal.

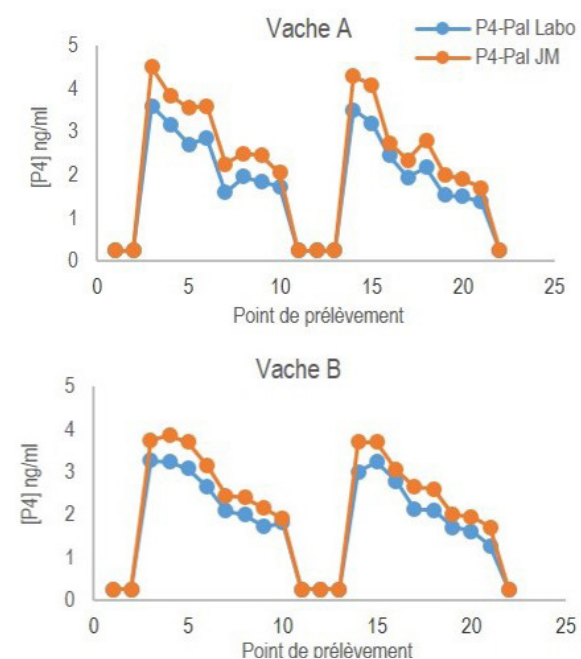


Figure 5. Progestérone plasmatique de 2 vaches A et B en utilisant la P4-Pal Labo ou la P4-Pal JM

Dans un second temps, la corrélation entre résultats a été étudiée sur toutes les espèces animales analysées au laboratoire. Le tableau 3 synthétise les résultats obtenus. Les coefficients de corrélation r varient entre 0,92 et 0,98 pour les 5 espèces, ce qui est acceptable.

Tableau 3 : Étendue des valeurs obtenues et coefficient de corrélation r P4-Pal Labo / P4-Pal JM pour chaque

Espèce	Effectif n	Étendue des valeurs obtenues (ng/ml)	Coefficient de corrélation r
Bovine	400	0,25 à 6,5	0,94
Caprine	159	0,25 à 14	0,98
Ovine	85	0,25 à 13	0,94
Équine	36	0,25 à 18,5	0,92
Porcine	54	0,25 à 32	0,96

Dans le cadre de la démarche qualité, à chaque nouveau couplage, une comparaison des résultats doit être effectuée entre la P4-Pal en cours d'utilisation et celle nouvellement produite. La gamme étalon et l'échantillon contrôle 2 doivent être déposés, et les résultats obtenus comparés. Seul un ajustement de la dilution de la P4-Pal récemment produite peut s'avérer nécessaire afin d'obtenir des résultats similaires avec l'utilisation de la P4-Pal en cours.

Conclusion

Le couplage de la progestérone à la phosphatase alcaline a été réalisé avec succès par l'équipe du laboratoire.

La comparaison entre les 2 P4-Pal, P4-Pal JM commercialisée et P4-Pal labo, montre que les résultats sont similaires avec une superposition des 2 gammes étalons, et que les valeurs des échantillons contrôles sont identiques, ce qui montre la fiabilité des résultats.

Dans le cadre de la démarche qualité, les critères de répétabilité et reproductibilité ont été évalués. Les valeurs des échantillons contrôles pour ces 2 critères sont identiques quelle que soit la P4-pal utilisée. En ce qui concerne le SEM, il oscille entre 1,2 % et 2,9 % pour la répétabilité et entre 1,8 % et 3,8 % pour la reproductibilité. Ces 2 critères sont satisfaisants.

Des corrélations ont été étudiées sur des résultats obtenus lors des dosages utilisant la P4-pal JM et la P4-pal labo. Ces dosages ont été effectués chez 5 espèces animales différentes (bovine, caprine, ovine, équine et porcine). Nous avons obtenu des coefficients de corrélation variant entre 0,92 et 0,98, ce qui montre l'existence de fortes corrélations.

Ainsi le laboratoire est, aujourd'hui, autonome sur la réalisation du couplage de la progestérone à la phosphatase alcaline, réactif indispensable pour la réalisation des dosages immunoenzymatiques. ■

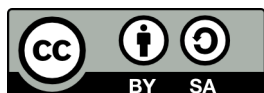
Références

Canépa S, Lainé AL, Bluteau A, Fagu C, Flon C, Monniaux D (2008). Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. Cah. Techn. Inra, 64, 19-30.

Driancourt MA, Freret S, Saint Dizier M (2014). Les cycles œstriens. La reproduction animale et humaine, Saint Dizier M., Chastant-Maillard S., coord, Eds, Quae, Versailles Chapitre 12, 219-234.

Saumande J, Tamboura D and Chupin D (1985). Changes in milk and plasma concentrations of progesterone in cows after treatment to induce superovulation and their relationships with number of ovulations and of embryos collected. Theriogenology 23, 719-731.

Sesay AM, Micheli L, Tervo P, Palleschi G, Virtanen V (2013). Development of a competitive immunoassay for the determination of cortisol in human saliva. Anal. Biochem, 434, 308-314.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.