

QUANTIFICATION DES PROTEASES MUSCULAIRES PAR IMMUNOCHIMIE

SENTANDREU[#] M. A., CHANTREAU[#] O., AUBRY[#] L., LEVIEUX* D. et OUALI[#] A.

[#] BPM, *Immunochimie, SRV, INRA-Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France.

Introduction

La variabilité de la qualité de la viande, en terme d'hygiène, de tendreté, de flaveur, de jutosité et de couleur, reste le problème majeur auquel sont confrontés les industriels de la filière. Parmi ces qualités, la tendreté demeure le facteur limitant principal de l'acceptabilité de la viande par le consommateur. L'une des raisons majeures de ces problèmes est très probablement la complexité du muscle squelettique. La tendreté résulte de l'altération de la structure contractile par les enzymes protéolytiques endogènes. La quantification de ces enzymes et des facteurs protéiques (inhibiteurs) contrôlant leurs activités est un moyen de prédire et d'expliquer cette variabilité biologique. Jusque là, la quantification des enzymes et de leurs inhibiteurs a été réalisée par mesure de leur activité biologique après fractionnement partiel ou, plus rarement, dans des extraits bruts de muscle. Cependant, ces techniques sont souvent compliquées, imprécises et nécessitent le plus fréquemment un fractionnement préalable de l'extrait musculaire excluant ainsi tout système protéolytique dont le fractionnement est trop complexe. A ces inconvénients, il faut en ajouter un autre d'importance qui concerne le nombre limité d'échantillons (3 à 4 au maximum) qu'il est possible d'analyser en parallèle par ces techniques. Il paraît donc essentiel d'envisager de nouvelles techniques plus spécifiques, plus rapides, plus précises, adaptées à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons et n'excluant aucun système protéolytique. Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi de faire appel aux outils immunochimiques déjà très utilisés dans le domaine de l'analyse médicale, et qui répondent en tout point à nos exigences. Nous nous proposons de faire ici, à l'aide d'exemples pratiques, une présentation succincte des principales techniques immunochimiques adaptées à notre problème.

Techniques immunochimiques

Deux types de techniques parmi les plus courantes seront présentées. Il s'agit de l'immunodiffusion radiale (Mancini) et de l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

- **Immunodiffusion radiale.** Cette technique repose sur la capacité de l'anticorps à former un complexe insoluble avec l'antigène cible. L'anticorps dirigé contre la protéine native est incorporé dans de la gélose. La gélose est coulée dans une boîte plastique ronde ou rectangulaire et maintenue à température ambiante jusqu'à solidification de gel. Des trous destinés à recevoir l'extrait tissulaire contenant l'antigène (3 à 15 μ l) sont percés à l'emporte-pièce. La migration de l'antigène dans la gélose avant précipitation par l'anticorps va être proportionnelle à la concentration de ce dernier. Le diamètre du cercle de précipitation permettra, par référence à une gamme étalon, de déterminer la concentration de l'antigène dans l'extrait. Cette technique est peu coûteuse, facile à mettre en œuvre et permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillon. Du fait de sa sensibilité moyenne, cette technique n'est adaptée qu'à des concentrations d'antigène supérieures ou égales à environ 10 μ g par millilitre d'extraits tissulaires.

- **ELISA**

Deux types de technique ELISA sont communément utilisés pour la quantification d'antigène en milieux complexes. Il s'agit de l'ELISA direct et de l'ELISA sandwich, les deux étant réalisées sur support solide (plaques de microtitration). Elles sont généralement très sensibles et adaptées à la quantification d'antigène dont la concentration est de l'ordre du ng/ml voire moins. Notons que le succès de ces techniques est principalement fonction de la qualité des anticorps dirigés contre l'antigène à quantifier.

- **ELISA direct :** L'extrait brut de tissu dilué est adsorbé dans les puits de la plaque de microtitration. Après lavage, l'anticorps (Anti-Ag) (polyclonal ou monoclonal) spécifique de l'antigène (Ag) recherché est ajouté à l'extrait. L'anticorps couplé à son antigène est ensuite révélé grâce à un anticorps (Anti-IgG) dirigé contre les immunoglobulines de l'espèce animale qui a servi à produire notre anticorps spécifique Anti-Ag. L'anti-IgG généralement marqué de façon covalente par une enzyme (peroxydase ou phosphatase) va donner, en présence de substrat spécifique de l'enzyme, une coloration directement proportionnelle à la quantité d'Anti-Ag fixée et donc à la quantité d'antigène présente.

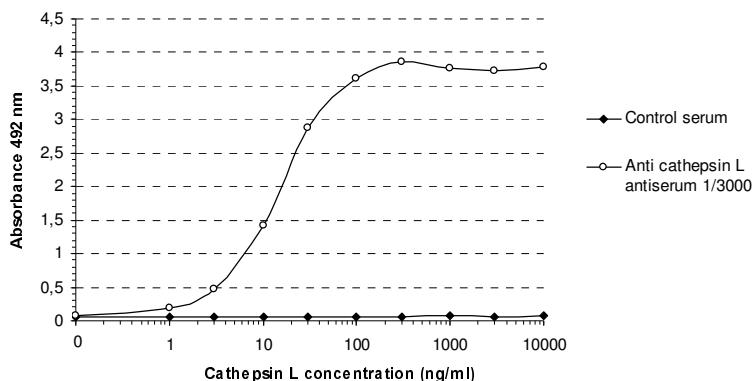
- **ELISA Sandwich:** Dans ce cas, un premier anticorps (anticorps de capture: monoclonal, anti-peptide, polyclonal) hautement spécifique de l'antigène d'intérêt est adsorbé dans le puits. L'extrait tissulaire est ensuite ajouté et l'antigène contenu dans l'extrait sera capturé par l'anticorps. Un second anticorps dirigé contre l'antigène sera ajouté et celui-ci sera révélé comme précédemment avec un Anti-IgG marqué. Cette technique, plus spécifique que la précédente, nécessite une grande rigueur et une formation préalable adaptée.

Quelques exemples d'application de ces techniques à la quantification de peptidases

A) Quantification de la cathepsine L par ELISA direct

Parmi les peptidases lysosomiales, la cathepsine L est celle qui a la plus grande capacité hydrolytique vis-à-vis des protéines cibles. Pour cette raison, on lui attribue souvent un rôle très important dans le processus d'attendrissage des viandes. Par voie de conséquence, il paraît donc essentiel de pouvoir la quantifier dans le tissu musculaire. Pour cela, un anticorps polyclonal dirigé contre une séquence peptidique propre à cette protéine a été développé et utilisé dans un premier temps en ELISA direct pour la quantification de la cathepsine L. La figure 1 est la courbe standard obtenue en déposant des concentrations croissantes (0 à 10 μ g/ml) de cathepsine L dans les puits de la microplaque de titration et en révélant cette cathepsine L avec l'antipeptide mentionné ci-dessus après marquage de ce dernier à la peroxydase. Selon cette courbe, il apparaît que des quantités de cathepsine L de l'ordre du nanogramme peuvent être détectées par ce test. Ce test préliminaire devrait évoluer vers un test ELISA sandwich, généralement plus spécifique, dans lequel le présent anticorps servira d'anticorps de capture, la révélation étant ensuite faite avec un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine native et marqué de façon covalente à l'aide de peroxydase.

Figure 1: Capacités de l'antipeptide, dilué au 1/3000, à reconnaître la cathepsine L déposée dans les puits de la plaque de microtitration. en comparaison avec un sérum de lapin non immunisé utilisé comme contrôle. La concentration de cathepsine L est portée sur une échelle logarithmique.



B) Quantification du protéasome 20S par immunodiffusion radiale

Le protéasome 20S est un complexe protéolytique de 700 kDa présent dans de nombreux tissus à des concentrations relativement élevées pouvant atteindre 1 mg/g de tissus. Dans le muscle, sa concentration varie entre 200 et 350 $\mu\text{g/g}$ de muscle frais [Dutaud, D., 1998]. Compte tenu de la concentration élevée de ce complexe et de son rôle dans le processus d'attendrissage de certains types de viande (viandes à pH élevé et viande provenant de muscle très oxydatifs [Dutaud, 1998; Ouali, 1999]), il a été décidé de mettre en place différents tests de quantification de type immunochimique. Le premier a été un test de dosage par immunodiffusion radiale qui est décrit ici. Celui-ci a été suivi du développement de deux tests ELISA sandwich plus sensibles destinés à la quantification de ce complexe dans le sérum humain [Dutaud et al., 2002] et dans le muscle de bovin.

Quantification du protéasome 20S par immunodiffusion radiale: l'anticorps polyclonal dirigé contre le complexe natif purifié est inclus dans la gélose (20-30 μl sérum/5ml de gélose). Dans les trous sont déposées différentes concentrations de protéasome purifié (6.25 à 200 $\mu\text{g/ml}$) et des extraits bruts des muscles *Longissimus Dorsi* et *Supraspinatus* de bovin (3 μl) (Fig. 2A). A partir de la gamme étalon (Fig. 2B), on en déduit la concentration de protéasome dans chaque extrait de muscle qui est de 250 $\mu\text{g/g}$ pour le muscle *Longissimus Dorsi* et de 200 $\mu\text{g/g}$ pour le muscle *Supraspinatus*.

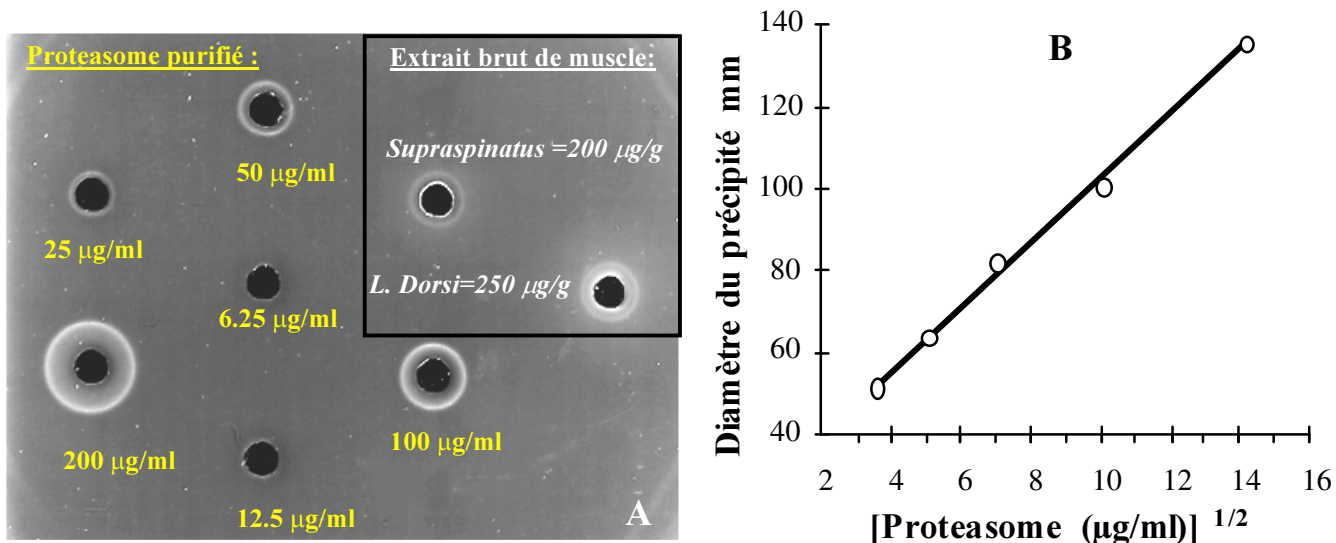


Figure 2: Immunodiffusion radiale conduisant à des cercles de précipitation du complexe antigène/anticorps dont le diamètre augmente avec la concentration de l'antigène. Sur la plaque de gélose (A) différentes concentrations d'antigène pur (protéasome) et deux extraits bruts de muscle de concentration inconnue sont déposées. Leur concentration est déduite de la courbe étalon (B) obtenue en portant le diamètre des cercles de précipitation en fonction de la racine carrée de la concentration en protéasome.

Conclusion

Les exemples présentés ici permettent de mettre en évidence la simplicité d'utilisation de ces techniques et leur utilité potentielle pour la quantification de marqueurs biologiques de qualité dans le cadre de la viande. Quelle que soit la technique, il faut garder à l'esprit que le point crucial est toujours la qualité des anticorps utilisés.

Références

- Barrett, A. J., Kirsche, H. (1981). Cathepsin B, Cathepsin H and Cathepsin L. *Methods Enzymol.* Vol. 80,535-561.
- Dutaud, D. (1998). Quantification et caractérisation du protéasome 20S de muscle de bovin en relation avec l'attendrissage de la viande bovine. Ph D thesis, Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France.
- Dutaud, D., Aubry, L., Henry, L., Levieux, D., Hendil, K.B., Kuehn, L., Bureau, J.P., Ouali, A. (2002) Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma, *J. Immunol. Methods.* 260, 183-193.
- Ouali A. (1999). Structure and biochemistry of muscle as related to meat texture. Proc. XIV European Symposium on the Quality of Poultry Meat (Bologna, Italy). Vol. 1, 91-121.