



JULIE JEAN

**PRODUCTION ET CARACTÉRISATION D'ANTICORPS POLYCLONAUX DIRIGÉS  
CONTRE LA VITAMINE D ET APPLICATION POUR L'ANALYSE DES PRODUITS  
LAITIERS FORTIFIÉS.**

Mémoire  
présenté  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Département des sciences des aliments et de nutrition  
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION  
UNIVERSITÉ LAVAL

NOVEMBRE 1998

© Julie Jean, 1998



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-38117-X

Canada

## AVANT-PROPOS

Cette recherche n'aurait pu être possible sans l'aide et le support de plusieurs personnes à qui j'adresse mes remerciements.

Premièrement, je désire remercier mon directeur, le Dr Ronald E. Simard qui a accepté la direction de mon mémoire et qui a permis par son support financier la réalisation de ce travail. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à mon codirecteur, le Dr Ismaïl Fliss, qui du début à la fin de mes travaux, m'a supportée par ses conseils scientifiques, sa patience, sa disponibilité et son enthousiasme.

Deuxièmement, je veux exprimer mon appréciation à tous ceux avec qui j'ai travaillé dans le laboratoire et qui en ont fait un endroit plaisant à travailler. Plus spécialement, je voudrais mentionner la contribution importante de M. Carl Turcotte pour ses précieux conseils techniques et ses encouragements.

Pour le soutien financier, je tiens à mentionner la contribution du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour la bourse (ÈS A) dont je me suis méritée, ainsi que la Fédération des producteurs laitiers du Canada pour la réalisation des travaux.

Finalement, ma profonde appréciation va à mes parents qui ont toujours cru en moi et m'ont toujours encouragée à réaliser mes rêves. Je tiens alors à les remercier pour leur support moral et émotionnel. À mon fiancé Frédéric, pour sa compréhension et son amour qui enrichit mon existence au quotidien, ainsi qu'à ses parents pour leurs encouragements à chacune des étapes de mon cheminement.

## RÉSUMÉ COURT

La vitamine D joue un rôle important dans la formation des os et des cartilages. Au Canada et aux États-Unis, le lait et les autres produits fortifiés sont les sources principales de vitamine D. La dose journalière recommandée pour un adulte est de 200 à 400 U.I.. Une surconsommation de vitamine D peut causer des problèmes et mener à une intoxication (Hasegawa, 1992). Une carence en vitamine D peut conduire à une absorption inadéquate du calcium et du phosphore pouvant aller jusqu'à des maladies telles que le rachitisme et l'ostéomalacie. Les méthodes actuelles de dosage de la vitamine D dans le lait sont limitées en terme de sensibilité, de rapidité et de simplicité. L'objectif de cette étude était donc de développer une nouvelle stratégie pour la quantification de la vitamine D dans le lait fortifié.

Au cours de ce projet, des anticorps spécifiques dirigés contre la vitamine D ont été produits chez des lapins. L'utilisation de la cBSA comme molécule transporteuse a permis d'augmenter le pouvoir immunogène de la vitamine D. La fraction IgG du sérum immun obtenu a été purifiée et utilisée pour le développement d'un Immunoblot et d'un ELISA indirect de type compétitif. Ces méthodes détectent de faibles concentrations de vitamine D en trois heures seulement lorsqu'elle est préalablement couplée à la cOVA. Le signal obtenu est parfaitement corrélé avec la quantité de vitamine D présente dans l'échantillon analysé.

Les stratégies développées semblent être très prometteuses en termes de sensibilité, de rapidité et de simplicité et offrent un grand potentiel pour l'automatisation et l'utilisation en analyse de routine de différents produits laitiers fortifiés.

## RÉSUMÉ LONG

La vitamine D joue un rôle essentiel dans la formation des os et des cartilages. Au Canada, en raison de l'exposition limitée au soleil, le lait et les produits laitiers fortifiés deviennent la source majeure de vitamine D dans le régime alimentaire de l'être humain. Cependant comme reporté dans plusieurs enquêtes épidémiologiques réalisées au Canada et aux États-Unis, le lait fortifié contient rarement la quantité de vitamine D indiquée sur l'étiquette et se retrouve donc surfortifié ou sousfortifié. Ces deux situations peuvent être néfastes pour la santé humaine et un contrôle de routine effectué systématiquement sur tous les lots produits s'avère donc nécessaire.

Les méthodes chromatographiques et biologiques sont les méthodes actuellement utilisées pour le dosage de la vitamine D dans le lait. Ces méthodes exigent souvent des étapes critiques de saponification et d'extraction qui les rendent coûteuses et limitées en termes de rapidité, de spécificité et de sensibilité. Le développement d'une méthode alternative beaucoup plus rapide, spécifique et sensible demeure une priorité et offrira sans doute à l'industrie laitière un outil plus efficace pour effectuer ce type de contrôle. L'objectif général de ce projet est de développer une approche immunologique basée sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux spécifiques pour la détection de la vitamine D dans les produits fortifiés.

Le présent travail est divisé en trois parties :

La première partie constitue d'une part par la revue de littérature dans laquelle les principes de base relatifs au métabolisme et au rôle de la vitamine D dans la santé sont présentés et d'autre part d'une description des méthodes de dosage de la vitamine D dans les aliments telles que les méthodes biologiques et analytiques et du potentiel des méthodes immunologiques en diagnostic agro-alimentaire.

Dans la deuxième partie, une stratégie moléculaire visant la conjugaison de la vitamine D à une molécule transporteuse de haut poids moléculaire a été développée. Le complexe ainsi obtenu a été utilisé pour produire des anticorps chez des lapines de type Nouvelle-Zélande. Les anticorps anti-vitamine D produits ont été purifiés puis utilisés pour développer un test immunoenzymatique de type Immunoblot.

Dans la dernière partie de ce travail, les anticorps anti-vitamine D ont été utilisés pour le développement d'une méthode immunoenzymatique de type ELISA compétitif. Ce système a été optimisé, en premier lieu pour le complexe cOVA-vitamine D et s'est révélé très performant. Des essais préliminaires sur la vitamine D seule sont en cours pour la validation du test développé.

En conclusion, la stratégie de couplage entre la vitamine D et la protéine transporteuse cationisée s'est révélée très efficace pour la production d'anticorps anti-vitamine D spécifiques. Les anticorps anti-vitamine D produits ont été utilisés pour le développement de deux tests immunoenzymatiques qui pourront ultérieurement être utilisés dans des analyses de routine pour déterminer la quantité réelle de vitamine D dans le lait et les produits laitiers fortifiés. Une telle mesure permettra de protéger ainsi le consommateur de risques sérieux de santé associés à une intoxication ou à une carence en vitamine D.

# TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.....	I
RÉSUMÉ COURT.....	II
RÉSUMÉ LONG .....	III
TABLE DES MATIÈRES .....	V
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des figures.....	IX
Liste des abréviations.....	XI
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 - REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
1.1    VITAMINE D: MÉTABOLISME ET RÔLE EN NUTRITION HUMAINE.....	3
1.1.1    Structure et caractéristiques chimiques de la vitamine D .....	3
1.1.2    Source de vitamine D chez l'humain.....	4
1.1.2.1    Sources endogènes.....	4
1.1.2.2    Sources exogènes : les aliments fortifiés .....	5
1.1.3    Devenir de la vitamine D dans l'organisme.....	6
1.1.4    Hypovitaminose D et hypervitaminose D.....	9
1.1.4.1    Hypovitaminose D .....	9
1.1.4.2    Hypervitaminose D.....	10
1.2.     DÉTECTION ET QUANTIFICATION DE LA VITAMINE D .....	11
1.2.1    Méthodes biologiques (bioessais sur des animaux supérieurs).....	11
1.2.1.1    Approche curative (bioessais sur les rats).....	12
1.2.1.2    Test prophylactique (bioessai sur les poussins (AOAC)) .....	12
1.2.2    Méthodes analytiques.....	13
1.2.2.1    Absorption ultraviolet.....	14
1.2.2.2    Méthodes colorimétriques.....	15
1.2.2.3    Méthodes chromatographiques.....	15
1.3    MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN DIAGNOSTIC AGRO-ALIMENTAIRE.....	16



1.3.1	Principe .....	16
1.3.2	Quelques définitions.....	16
1.3.2.1	Antigènes .....	16
1.3.2.2	Anticorps.....	17
1.3.3	Différents formats de tests immunologiques .....	19
1.3.3.1	Principe de double capture.....	21
1.3.3.2	Principe de compétition directe avec des antigènes marqués.....	22
1.3.3.3	Principe de compétition indirecte avec des anticorps marqués .....	23
1.3.4	Applications des essais immunologiques en analyse des aliments .....	24
1.4	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS .....	25
1.4.1	Hypothèse .....	25
1.4.2	Objectifs.....	25
1.5	RÉFÉRENCES.....	27

## CHAPITRE 2 -

<b>LA PRODUCTION ET LA CARACTÉRISATION D'ANTICORPS POLYCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LE CHOLECALCIFÉROL (VITAMINE D<sub>3</sub>).</b> .....	<b>30</b>
--	-----------

<b>PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST CHOLECALCIFEROL (VITAMIN D<sub>3</sub>).</b> .....	<b>30</b>
--	-----------

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>31</b>
---------------------	-----------

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>32</b>
-----------------------	-----------

2.1	INTRODUCTION.....	33
2.2	MATERIAL AND METHODS .....	34
2.2.1	Preparation of antigen .....	34
2.2.2	Cationization .....	35
2.2.3	Conjugation reaction .....	35
2.2.4	Production of anti-vitamin D antibodies.....	36
2.2.5	Purification of specific anti-vitamin D antibodies .....	36
2.2.6	Dot immunoassay.....	37
2.3	RESULTS .....	38
2.3.1	Efficiency of the cationization reaction.....	38
2.3.2	Conjugation of vitamin D to cBSA.....	38
2.3.3	Production of anti-vitamin D antibodies .....	38
2.4	DISCUSSION.....	40

2.5	REFERENCES.....	42	
2.6	FIGURES AND TABLES.....	44	
<b>CHAPITRE 3 -</b>			
<b>DÉVELOPPEMENT D'UN TEST ELISA COMPÉTITIF POUR</b>			
<b>LE DOSAGE DE LA VITAMINE D.....</b>			<b>52</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>			<b>53</b>
3.1	INTRODUCTION.....	55	
3.2	MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	56	
3.2.1	Préparation du complexe cOVA-vitamine D.....	56	
3.2.2	Anticorps anti-vitamine D.....	57	
3.2.3	Procédure de l'ELISA compétitif.....	57	
3.3	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	58	
3.4	RÉFÉRENCES.....	60	
3.5	FIGURES ET TABLEAUX.....	62	
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>			<b>67</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.1</b> - Contenu en vitamine D de quelques aliments non-fortifiés.....	<b>5</b>
<b>Tableau 3.1</b> - Évaluation du ratio signal de l'ELISA compétitif en présence de cOVA-vitamine D sur celui en absence de cOVA-vitamine D.....	<b>69</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1 -</b> Structure chimique de la vitamine D <sub>3</sub> .....	<b>3</b>
<b>Figure 1.2 -</b> Métabolisme et fonctions de la vitamine D <sub>3</sub> .....	<b>8</b>
<b>Figure 1.3 -</b> Symptômes de la carence en vitamine D: le rachitisme chez les enfants.....	<b>10</b>
<b>Figure 1.4 -</b> Structure des immunoglobulines G (IgG).....	<b>17</b>
<b>Figure 1.5 –</b> Principe d’un test en double capture avec anticorps marqué (sandwich).....	<b>22</b>
<b>Figure 1.6 –</b> Principe d’un test compétitif direct utilisant des antigènes marqués.....	<b>23</b>
<b>Figure 1.7-</b> Principe d’un test compétitif indirect utilisant des anticorps marqués.....	<b>24</b>
<b>Figure 2.1 -</b> Preparation of cationized BSA and cBSA-vitamin D conjugate.....	<b>47</b>
<b>Figure 2.2 -</b> Illustration of the three-step anti-vitamin D purification strategy .....	<b>48</b>
<b>Figure 2.3 -</b> Analysis of cBSA and nBSA by a native 10% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis .....	<b>49</b>
<b>Figure 2.4 -</b> Analysis of the conjugation products by mid-infrared spectroscopy.....	<b>51</b>
<b>Figure 2.5 -</b> Immunogenicity of vitamin D and cBSA-vitamin D complex as determined by dot immunoassay.....	<b>52</b>

<b>Figure 2.6 - Variations of the specificity of the rabbit anti-serum as a function of purification steps.....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 3.1 - Principe de test ELISA compétitif.....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 3.2 - Variation du signal obtenu par ELISA compétitif en fonction de la concentration en anticorps anti-vitamine D en présence et en absence de cOVA-vitamine D.....</b>	<b>67</b>
<b>Figure 3.3 - Étude de la corrélation entre la concentration en cOVA-vitamine D et le signal obtenu par ELISA compétitif.....</b>	<b>68</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

BR :	Blocking Reagent
BSA :	Bovine Serum Albumin
nBSA :	Native Bovine Serum Albumin
cBSA :	Cationized Bovine Serum Albumin
EDA :	Ethylenediamine
EDC :	1-ethyl-3-[3-methylaminopropyl]-carbodiimide hydrochloride]
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
IgG :	Immunoglobulin G
IU :	International Units
NaCl :	Sodium Chloride
OPD :	Orthophenylene Diamine
OVA :	Ovalbumin
nOVA :	Native Ovalbumin
cOVA :	Cationized Ovalbumin
PBS :	Phosphate Buffer Saline
TBS-T :	Tris Buffer Saline with 0.1% Tween 20
UI :	Unités internationales

## INTRODUCTION

Les vitamines sont des composés organiques, essentiels à la vie, qui entrent dans la composition du corps humain mais en très faible quantités. Ne pouvant être synthétisées par l'organisme, les vitamines doivent donc provenir de l'alimentation même si, pour certaines d'entre elles, elles ne représentent que 1/500 000 du total des *ingesta* journaliers. La déficience en vitamine cause des troubles caractéristiques et peut même entraîner la mort.

La vitamine D est une vitamine parmi celles dont un supplément est souvent nécessaire pour atteindre la dose journalière requise pour un adulte. En effet, les aliments sont des sources pauvres en vitamine D. L'exposition au soleil, les préparations commerciales de vitamine D et particulièrement les produits fortifiés demeurent essentiellement les seules sources de vitamine D pour les humains.

Au Canada, en raison de l'exposition limitée au soleil, le lait et les produits laitiers fortifiés deviennent la source essentielle de vitamine D dans le régime alimentaire. La consommation des doses recommandées de vitamine D ne cause pas de problème. Cependant, une déficience ou un excès de vitamine D sont souvent associés à des disfonctions sérieuses à la santé. Tel que rapporté dans plusieurs enquêtes épidémiologiques réalisées au Canada et aux États-Unis, le lait fortifié contient rarement la quantité de vitamine D indiquée sur l'étiquette et peut être soit « sur-fortifié » ou « sous-fortifié ». Les deux cas sont néfastes pour l'humain. La déficience en vitamine D entraîne une incapacité de maintenir des concentrations normales en calcium et en phosphore dans le sérum. Ceci est souvent accompagné par une déperdition accélérée des os et entraîne subséquemment l'ostéomalachie, désordre de la minéralisation des os accompagnée de douleur, de difformités osseuses et de fractures multiples. Chez les enfants, la déficience en vitamine D conduit au rachitisme. Les patients ayant une intoxication à la vitamine D montrent des symptômes cliniques variés incluant une perte de poids avec anorexie,

constipation et vomissements. Un contrôle plus rigoureux du procédé de fortification est donc nécessaire pour éviter ces accidents.

Les méthodes traditionnelles, incluant les méthodes biologiques et chromatographiques, utilisées pour la quantification de la vitamine D sont longues, peu sensibles, peu spécifiques et coûteuses. Les méthodes biologiques reposent principalement sur la mesure de la minéralisation des os d'animaux supérieurs. Les méthodes chromatographiques sont compliquées à exécuter exigeant des étapes de saponification et d'extraction longues dans lesquelles une quantité non négligeable de vitamine est perdue. De plus, une ressource humaine spécialisée est souvent nécessaire pour effectuer ces méthodes, ce qui les rend inconvenables pour une utilisation routinière.



# CHAPITRE 1

## REVUE DE LITTÉRATURE

### 1.1 VITAMINE D: MÉTABOLISME ET RÔLE EN NUTRITION HUMAINE

#### 1.1.1 Structure et caractéristiques chimiques de la vitamine D

La vitamine D fait partie d'un groupe de composés chimiques distincts, les stérols. Elle possède un poids moléculaire de 384 Da et une structure chimique relativement simple (figure 1.1).

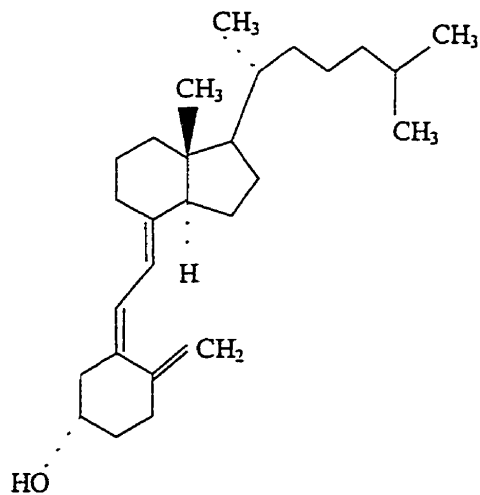


Figure 1.1 - Structure chimique de la vitamine D<sub>3</sub>.

La vitamine D fait partie des vitamines liposolubles. Elle est insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques avec un coefficient d'extinction molaire de 18 300 dans l'alcool ou l'hexane. Son point de fusion est de 84-85°C. Elle possède une absorption maximale dans la région ultraviolette à 264-265 nm.

La vitamine D est très résistante à la chaleur ainsi qu'aux acides et aux bases. Cependant, elle est très instable à la lumière et s'oxyde facilement lorsqu'elle est exposée à l'air pendant 24 à 72 heures.

### **1.1.2 Source de vitamine D chez l'humain**

Chez les êtres humains, la source de vitamine D se présente sous forme exogène ou endogène (Yendt, 1994).

#### **1.1.2.1 Sources endogènes**

La vitamine D endogène est synthétisée par la peau à partir d'un précurseur, le 7-déshydrocholestérol (7-DHC) également appelé ergostérol ou provitamine D<sub>3</sub> retrouvé dans les plantes. Le 7-DHC est localisé dans la couche malpighienne de la peau (Machlin, 1991). Les rayons solaires ultraviolets-B (UVB) (290-315 nm) initient la synthèse cutanée de la vitamine D par la photo-conversion du 7-DHC en prévitamine D<sub>3</sub> (ergocalciférol) lequel après une période de deux à trois jours à la température du corps est spontanément transformé en cholecalciférol (Webb et al., 1988). Certains facteurs peuvent influencer la production de vitamine D par la peau, parmi lesquels l'irradiation solaire terrestre, l'âge, le contenu en mélanine de la peau et l'usage des écrans solaires (McKenna, 1991). Les inégalités entre les différentes régions du globe dans la synthèse de la vitamine D endogène peuvent être expliquées par la variation de l'intensité de la radiation durant l'année. Au cours de l'hiver, il n'y a pas de changement dans la production de la vitamine D dans les latitudes subtropicales. Cependant, cette production est considérablement réduite dans les basses latitudes et complètement arrêtée durant 4 à 6 mois dans les hautes latitudes.

Au Canada par exemple, les rayons solaires sont filtrés à un angle plus oblique à travers la couche d'ozone atmosphérique, ce qui réduit les radiations UVB atteignant la surface de la terre. Par conséquent, la production de vitamine D au niveau de la peau cesse d'octobre à la fin février dans la plupart des régions du Canada. À Edmonton, situé au nord du 52<sup>e</sup> parallèle, cette production cesse jusqu'à la fin mars. Pour cette région, les apports en vitamine D contenus dans les aliments fortifiés et dans les suppléments deviennent la majeure et peut-être la seule source de vitamine D pour les habitants (Webb et al, 1990).

### 1.1.2.2 Sources exogènes : les aliments fortifiés

Les sources exogènes sont très rares puisque dans la nature, on ne retrouve pas de sources riches en vitamine D autres que certaines huiles ou tissus de poissons. D'autres aliments tels que le foie, le lait et le jaune d'œuf peuvent contenir de petites quantités de vitamine D mais pas suffisamment pour satisfaire les besoins quotidiens d'un adulte (tableau 1.1) d'où l'importance des aliments fortifiés.

**Tableau 1.1 – Contenu en vitamine D de quelques aliments non-fortifiés.**

Aliments	Contenu en vitamine D (UI/100g)
Beurre	35
Fromage	12
Jaune d'œuf	25
Foie de veau (cru)	0-15
Lait de vache	0,3-4

Source : Booher and al. (1942)

Au Canada et aux États-Unis, environ 85% du lait commercial et presque tous les laits évaporés sont fortifiés en vitamine D (Webb et al, 1990). Le lait convient spécialement à la fortification puisqu'il contient du calcium et du phosphore dont l'absorption est facilitée par la présence de vitamine D. Au Canada, le lait et la margarine sont fortifiés en vitamine D afin de rencontrer les normes fédérales. Ces aliments constituent la source majeure de vitamine D chez la plupart des individus.

Des récentes constatations sur l'intoxication ou la carence en vitamine D ont suscité des questions concernant la quantité réelle de vitamine D ajoutée dans le lait et les produits laitiers fortifiés. Une récente enquête, conduite au Canada et aux États-Unis, a clairement montré que le lait et les formules pour nourrissons contiennent rarement la quantité de vitamine D indiquée sur l'étiquette (Cottrel, 1988 et Holick et al., 1992). Chen et al.(1993) rapportaient récemment que 80% des échantillons de lait pris aux États-Unis contenaient 20% de moins ou 20% de plus de vitamine D de la quantité indiquée sur l'étiquette. Les résultats dans les échantillons de lait pris au Canada montraient que 73% des échantillons contenaient moins que 80% ou plus que 120% de la quantité de vitamine D requise. Quatorze pourcent des échantillons ne contenaient pas de vitamine D détectable alors qu'un échantillon de lait entier contenait 363% de la quantité indiquée sur l'étiquette.

### **1.1.3. Devenir de la vitamine D dans l'organisme**

La vitamine D est biologiquement inactive et doit donc subir plusieurs changements chimiques dans l'organisme avant de devenir active (figure 1.2). Il est connu que pour produire ces effets biologiques, la vitamine D doit être hydroxylée aux positions C-1 et C-25. À noter que seulement 50% de la dose de vitamine D ingérée est absorbée au niveau de l'intestin.

Une fois synthétisée au niveau de la peau ou absorbée au niveau de l'intestin, la vitamine D est transportée à deux endroits majeurs de transformations, le foie et les reins. Le transport de la vitamine D dans le sang est assuré par une protéine spécifique (DBP, vitamin D-binding protein) qui se lie à la vitamine D par un lien non-covalent. Comme pour les autres stéroïdes

hydrophobes qui doivent circuler dans le milieu aqueux du plasma, le rôle de ces molécules porteuses n'est pas totalement élucidé. En général, l'affinité entre ces deux molécules est grande et se fait de façon très rapide (Machlin, 1991). Chez l'humain, la DBP est une protéine globulaire ayant un poids moléculaire de 58 000 daltons.

Dans le foie, la vitamine D est stockée comme la majorité des vitamines liposolubles. C'est également dans cette organe que la vitamine D est convertie en hydroxyvitamine D (25-OHD), métabolite majeur de la vitamine D dans la circulation mais qui n'a aucune fonction directe sur les tissus cibles. Cette transformation est catalysée par une enzyme, la vitamine D 25-hydrolase.

La 25-OHD est par la suite transportée aux reins où elle est convertie en 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25-(OH)<sub>2</sub>D), qui est le métabolite biologiquement actif de la vitamine D (Reichel et al., 1989). Cette fois, c'est la 25-hydroxyvitamine D<sub>3</sub>-1- $\alpha$ -hydrolase qui assure la réaction. Sous cette forme, la 1,25-(OH)<sub>2</sub>D joue un rôle hormonal et est alors transportée par le sang aux récepteurs intracellulaires qui régulent la transcription des gènes et la fonction cellulaire dans une vaste variété de tissus.

Les intestins, les os et les reins sont les trois organes cibles classiques pour la 1,25-(OH)<sub>2</sub>D. Dans l'intestin, la 1,25-(OH)<sub>2</sub>D va agir à titre d'hormone au niveau du noyau de l'entérocyte pour provoquer la synthèse d'une protéine liante favorisant l'absorption intestinale du calcium. Dans les os, la 1,25-(OH)<sub>2</sub>D stimule la résorption de certains minéraux, de cette manière elle libère le calcium dans le liquide extracellulaire. Dans les reins, la concentration en 1,25-(OH)<sub>2</sub>D agit en régulant la conversion de 25-OHD en 1,25-(OH)<sub>2</sub>D et par conséquent fournit un mécanisme de contrôle rigoureux de la 1,25-(OH)<sub>2</sub>D selon les besoins en calcium de la personne (Yendt, 1994). Cette molécule joue aussi un rôle dans la régulation du calcium rénal et dans l'excrétion du phosphate.

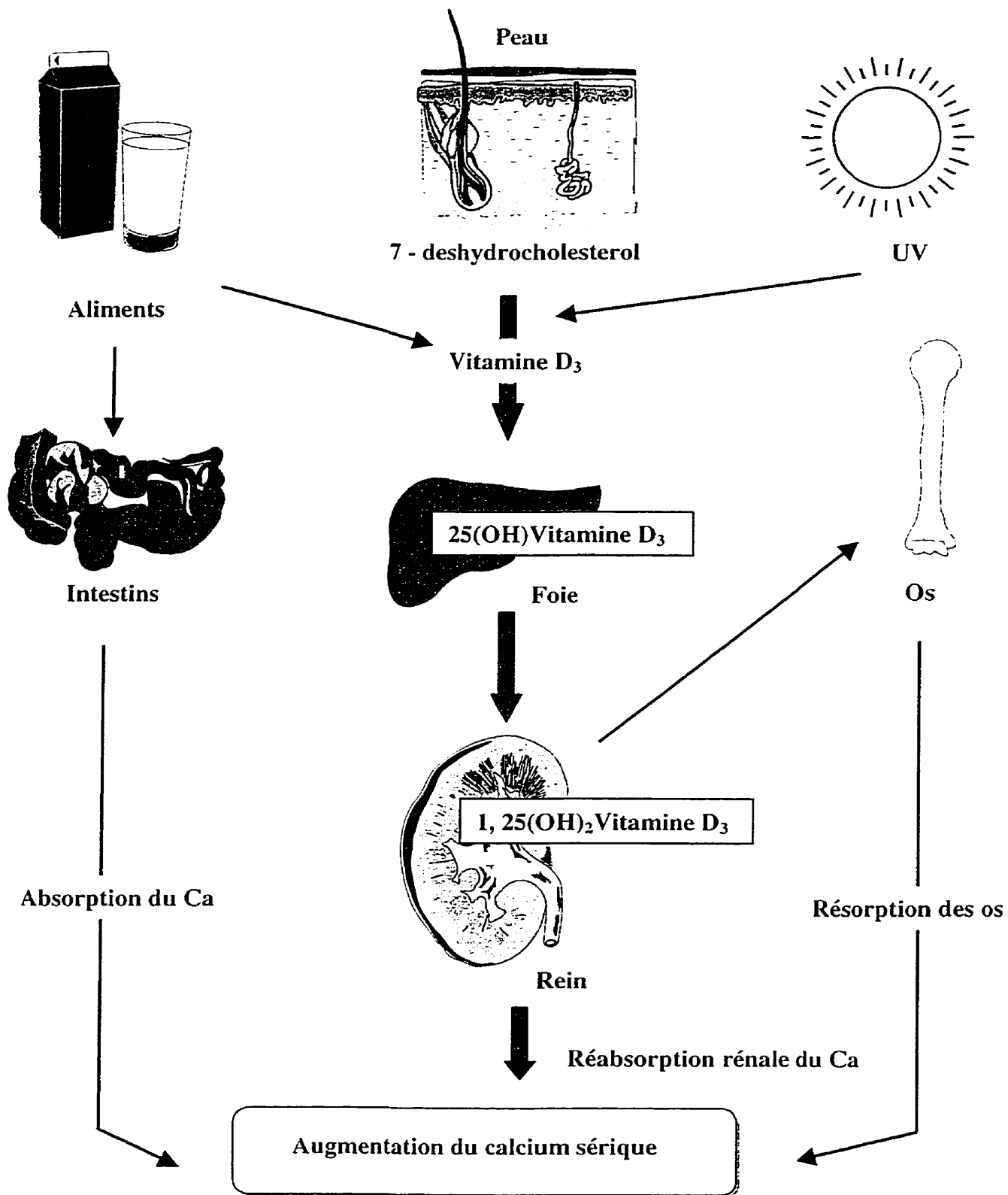


Figure 1.2 – Métabolisme et fonctions de la vitamine D<sub>3</sub>.

#### **1.1.4. Hypovitaminose D et hypervitaminose D**

L'apport nutritionnel recommandé en vitamine pour un adulte canadien est de 200 à 400 UI par jour (Yendt, 1994). Une carence ou un excès en vitamine D sont habituellement associés à des troubles métaboliques graves (Hasegawa, 1992).

##### **1.1.4.1 Hypovitaminose D**

Deux causes majeures peuvent provoquer l'hypovitaminose D, une faible synthèse de vitamine D cutanée à la suite d'une exposition limitée aux rayons UVB et une consommation inadéquate des produits laitiers fortifiés. La déficience en vitamine D résulte en une absorption intestinale et une réabsorption rénale inadéquates du calcium et du phosphore. Ceci entraîne une incapacité de maintenir des concentrations normales en calcium et en phosphate dans le sérum. En réponse à ce faible niveau de calcium dans le sang, l'hyperparathyroïdisme survient (Machlin, 1991). Il s'agit d'un désordre minéral souvent accompagné par une déperdition accélérée (déminéralisation) des os et entraîne subséquentement l'ostéomalacie. Ce désordre de la minéralisation des os est souvent accompagné de douleur, de difformités osseuses et de fractures multiples. Chez les enfants, la déficience en vitamine D conduit au rachitisme (Parfitt, 1990). Les symptômes classiques associés au rachitisme sont les jambes arquées, les genoux cagneux, la déviation de la colonne vertébrale et les difformités pelviennes et thoraciques (Fig.1.3) (Machlin, 1991) résultant de l'application du mécanisme normal de stress de la déminéralisation des os. L'hypertrophie des os, spécialement des genoux, des poignets et des chevilles, ainsi qu'une minéralisation inadéquate de l'émail des dents et de la dentine surviennent généralement. Si la déficience a lieu au cours des six premiers mois de la vie, celle-ci peut même mener à des convulsions et au tétanos.



**Figure 1.3** - Apparence classique du rachitisme chez les enfants.

#### **1.1.4.2 Hypervitaminose D**

Il est bien établi que la consommation continue de vitamine D est toxique pour l'humain (Deluca, 1978). L'intoxication par la vitamine D survient habituellement en raison de l'utilisation impropre des préparations pharmaceutiques de vitamine D chez des patients qui consomment des suppléments vitaminiques afin de traiter l'hypoparathyroïdisme, l'ostéodystrophie rénale, l'ostéoporose, le psoriasis et certains cancers (Machlin, 1991). Les aliments fortifiés en vitamine D peuvent aussi causer une intoxication. Cependant, il n'y a pas de cas documentés dus à une exposition excessive au soleil (Jacobus et al., 1992). L'hypervitaminose est un problème sérieux puisqu'il peut en résulter une calcification irréversible du cœur, des poumons, des reins et d'autres organes. Les patients ayant une intoxication à la vitamine D montrent des symptômes cliniques variés incluant une hypercalcémie, une perte de poids avec anorexie, la constipation, des nausées et vomissements, la soif, des faiblesses musculaires, des douleurs aux articulations et aux os et des calculs rénaux. Si la maladie n'est pas soignée, la mort peut éventuellement survenir (Machlin, 1991).



La dose minimale toxique a été estimée à 50 000 UI pour un adulte et à 1000 à 2000 pour un enfant et pour les adultes ayant certaines infections et maladies métaboliques. Au début de l'intoxication, les effets sont réversibles. Le traitement consiste à retirer la vitamine D et à réduire la dose de calcium dans la diète jusqu'à ce que son niveau sérique diminue. Dans les cas plus sévères, on utilise un traitement au glucocorticoïdes qui possèdent un effet antagoniste à celui de la vitamine D et peuvent donc faciliter la correction de l'hypercalcémie (Machlin, 1991).

## **1.2. DÉTECTION ET QUANTIFICATION DE LA VITAMINE D**

Après la vitamine B<sub>12</sub>, la vitamine D est la plus puissante des vitamines telle que définie par la quantité minimale requise pour provoquer une réponse biologique. Par conséquent, les tissus et les échantillons biologiques contiennent des très faibles concentrations de vitamine D. Par exemple, le niveau de vitamine D<sub>3</sub> dans le plasma chez l'humain est de seulement 10 à 20 ng/ml. Dans les aliments, la quantité de vitamine D est également très faible et il est habituellement nécessaire de traiter des quantités importantes, soit des échantillons pesant entre 50 et 100 g pour pouvoir la détecter (Machlin, 1991). Avec des échantillons de petite taille, la quantité de matériel vitaminique récolté permet difficilement de se situer au-delà des limites de détection de la plupart des méthodes de dosage. Ainsi, pour pouvoir détecter de telles concentrations de vitamine D, les méthodes de dosage doivent être spécifiques et sensibles. Les méthodes actuelles utilisées pour le dosage de la vitamine D peuvent être divisées en méthodes chimiques et biologiques.

### **1.2.1 Méthodes biologiques (bioessais sur des animaux supérieurs)**

Trois catégories de bioessais avec les animaux supérieurs peuvent être utilisées pour doser la vitamine D.

- Approche curative;
- Approche prophylactique;

- Approche d'absorption du calcium.

### **1.2.1.1 Approche curative (bioessais sur les rats)**

Au cours des années 1922 à 1958, la seule méthode officielle pour la détermination de la vitamine D dans les produits pharmaceutiques et alimentaires était le bioessai sur les rats (Rat Line Test). Le terme officiel indique ici que la reproductibilité et la précision de la méthode sont suffisamment élevée pour que les résultats du test soient acceptés légalement. Cette méthode qui est capable de détecter de 1 à 12 UI (25-300 ng) de vitamine D est encore utilisée pour déterminer la quantité de vitamine D dans les aliments, particulièrement dans les formules lactées pour nourrissons (Official Methods of Analysis, 1990).

Dans l'approche curative, des rats atteints de rachitisme auxquels une diète rachitogénique a été administrée pour une période de 19 à 25 jours sont utilisés. Ces rats sont ensuite divisés en groupes de 7 à 10 animaux et sont soumis à une diète supplémentée en quantités connues de vitamine D comme référence et à des quantités inconnues pour l'échantillon à analyser (Machlin, 1991). Cette diète est maintenue pendant une période de 7 jours à la suite de laquelle les animaux sont sacrifiés et où le radius et le cubitus sont prélevés et colorés dans une solution au nitrate d'argent. L'argent se fixe sur les régions où du calcium a été récemment déposé et ces régions noircissent lorsqu'elles sont exposées à la lumière. Ainsi, l'étendue de la calcification est comparée avec les résultats obtenus du groupe de référence.

### **1.2.1.2 Test prophylactique (bioessai sur les poussins (AOAC))**

Chez la plupart des mammifères, les activités biologiques respectives de la vitamine D<sub>2</sub> et de la vitamine D<sub>3</sub> sont équivalentes mais les oiseaux métabolisent difficilement la vitamine D<sub>2</sub>. En effet, pour les oiseaux, la vitamine D<sub>2</sub> ne possède qu'environ 10% de l'activité de la vitamine D<sub>3</sub>. L'AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) a alors reconnu le bioessai sur les poussins comme la méthode de référence pour la mesure spécifique de la vitamine D<sub>3</sub>.

Des groupes de 20 poussins fraîchement éclos sont nourris avec une diète dépourvue de vitamine D mais à laquelle des quantités prédéterminées de l'échantillon à doser ont été ajoutées. Après trois semaines de diète, le degré de minéralisation osseuse est mesuré. L'étendue de la minéralisation est évaluée par incinération du tibia. Chez les oiseaux rachitiques, on mesure de 25 à 27% de cendres provenant du tibia et ceux ayant reçu une diète enrichie de vitamine D<sub>3</sub> ont de 40 à 45% de cendres. Ces essais ne sont pas fréquemment utilisés puisqu'ils sont très longs et dispendieux.

D'autres méthodes ont également été développées et sont basées sur l'habilité de la vitamine D à stimuler l'absorption du calcium à travers l'intestin grêle. D'autres méthodes de dosage observe quant à elles la mobilisation du calcium au niveau du squelette ou de la stimulation de la croissance.

Des essais radioimmunologiques ainsi que des essais immunoenzymatiques ont été développés afin de mesurer la présence d'une protéine, la calbindine D<sub>28K</sub> qui est un indicateur de l'activité de la vitamine D. Cette protéine n'est pas présente dans l'intestin des poussins si leur alimentation est déficiente en vitamine D et est seulement synthétisée en réponse d'une consommation de vitamine D. Ces méthodes peuvent détecter des quantités de l'ordre du nanogramme de calbindine D<sub>28K</sub> (Machlin, 1991).

### 1.2.2 Méthodes analytiques

Au cours des dernières années, plusieurs travaux ont été consacrés au développement de nouvelles méthodes analytiques pour le dosage des vitamines liposolubles dans les aliments. Malgré ces progrès, ces méthodes présentent un manque de sensibilité et de spécificité (Machlin, 1991). Ainsi, elles ne sont pas adéquates pour la quantification de faibles concentrations de vitamine D. Elles ont cependant l'avantage d'être un peu moins longues que les méthodes biologiques et sont fréquemment utilisées pour le dosage d'échantillons reconnus pour contenir de hautes concentrations en vitamine D.

Le dosage de la vitamine D dans les aliments pose des difficultés techniques particulières en raison de la présence dans la matrice de quantités excessives de gras, de protéines et de stérols incluant le cholestérol (Hagar et al., 1993). Quelques-uns de ces composés ont des propriétés chimiques et physiques similaires et peuvent interférer lors de l'analyse (Agarwal, 1987). Avant d'utiliser les techniques analytiques, il est souvent nécessaire d'extraire, de concentrer et de purifier partiellement la source de vitamine D. Ces étapes préalables dépendent largement de la méthode d'analyse choisie et du matériel à doser. De plus, il est nécessaire de saponifier et d'extraire la fraction saponifiable à l'aide de solvants organiques tel un mélange d'hexane (Sliva and al., 1992) et d'éther éthylique, pour ensuite purifier les extraits avant le dosage. La purification des extraits peut être réalisée par chromatographie d'adsorption sur support de silice ou d'alumine.

La vitamine D est sensible à la chaleur, à la lumière et à l'oxydation, ce qui cause une perte significative au cours de l'extraction et des étapes de lavage (Renken et Warthesen, 1993; Sliva and al., 1992; Hagar et al., 1993). Il est alors recommandé d'opérer en tout temps sous gaz inerte et en présence d'antioxydant. À la chaleur, la vitamine D participe à des réactions d'isomérisation réversibles. L'équilibre de la réaction est toutefois dépendant de la température. Il est donc possible d'établir des facteurs de correction pour tenir compte du phénomène. D'autre part, la saponification à froid, soit à la température de la pièce pour une nuit, permet de contourner ce problème.

#### **1.2.2.1 Absorption ultraviolet**

La première technique disponible pour la quantification de la vitamine D était basée sur la mesure de l'absorption ultraviolet à 264 nm. Le système triène conjugué de doubles liaisons de la vitamine D produit une forte absorption caractéristique sur un spectre (Machlin, 1991). Cette absorption maximale survient à 264 nm. Ainsi, la concentration d'un échantillon inconnu de vitamine D peut être déterminée par comparaison du spectre d'absorption à une courbe d'étalonnage. Cette technique est très simple et rapide mais doit être utilisée seulement avec

des échantillons scrupuleusement purifiés afin d'éviter les contaminants pouvant absorber à cette longueur d'onde.

### **1.2.2.2 Méthodes colorimétriques**

Plusieurs méthodes colorimétriques pour la quantification de la vitamine D ont été développées. Parmi ces méthodes, on retrouve celle basée sur l'isomérisation de la vitamine D en isotachysterol. Cette réaction emploie le trichlorure d'antimoine et peut détecter la vitamine D à des quantités variant de 1 à 1000 µg. Puisque cette méthode ne détecte que de grande quantité de vitamine D, elle est maintenant utilisée pour déterminer la concentration de vitamine D dans les préparations pharmaceutiques et est devenue la méthode colorimétriques USP (United States Pharmacopeia) pour la vitamine D<sub>3</sub>. Dans cette technique, trois types de tubes essai sont normalement préparés : un contenant un standard de vitamine D ou l'échantillon inconnu additionné du réactif coloré, un contenant seulement le solvant, le chlorure d'éthylène et un troisième contenant le chlorure d'éthylène, de l'anhydride acétique et le réactif coloré. L'absorbance est mesurée à 500 nm, 45 secondes après l'addition du réactif coloré. La concentration en vitamine D est proportionnelle à cette absorbance et corrigée avec le blanc réalisé avec seulement le solvant. Cette technique suit la règle de Beer-Lambert pour des solutions contenant de 3,25 à 6,5 nmoles de vitamine par millilitre de solution (Machlin, 1991). Le désavantage majeur de cette méthode réside dans la présence de la vitamine A dans les préparations pharmaceutiques qui interfère dans la mesure. On doit alors purifier l'échantillon avant le dosage.

### **1.2.2.3 Méthodes chromatographiques**

Parmi les autres méthodes analytiques, on retrouve les chromatographies gazeuse et liquide (Machlin, 1991; Hasegawa, 1992; Sliva and al., 1992; Hagar, 1993). L'application de ces méthodes chromatographiques a certainement amélioré les analyses de la vitamine D au cours des dernières années. Cependant, ces méthodes demeurent limitées en terme de rapidité (3 à 4 jours), de sensibilité et de coût. Toutes les méthodes chromatographiques rapportées dans la

littérature incluent des étapes d'extraction et de saponification longues au cours desquelles une quantité importante de vitamine D est perdue. Des étapes de purification de l'extrait par une technique sur colonne conventionnelle sont également nécessaires afin d'injecter une quantité suffisante de matériel dans la colonne sans la surcharger inutilement d'impuretés. De plus, la quantité est mesurée par absorbance ce qui limite considérablement la spécificité et la sensibilité de ces méthodes (Hollis, 1986).

### **1.3 MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES EN DIAGNOSTIC AGRO-ALIMENTAIRE**

#### **1.3.1 Principe**

Les méthodes immunologiques sont des méthodes de détection basées sur l'utilisation de molécules de nature protéique (anticorps) capables de reconnaître et de se lier sélectivement à d'autres protéines qui leur sont spécifiques (antigènes) (Rittenburg, 1990).

#### **1.3.2 Quelques définitions**

##### **1.3.2.1 Antigènes**

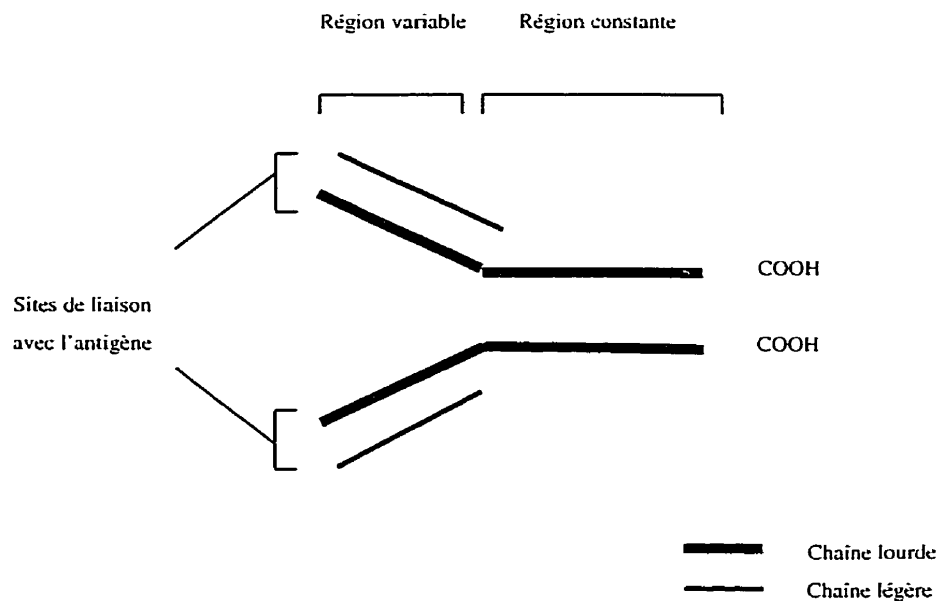
Le mot antigène désigne toute substance étrangère capable de stimuler la synthèse d'anticorps et par la suite de réagir spécifiquement avec ceux-ci. Une vaste gamme de composés peuvent être antigéniques. La grosseur, la structure chimique, la solubilité dans les fluides physiologiques et le caractère étranger à l'organisme des différentes molécules conditionnent leur caractère immunogène, c'est-à-dire leur capacité à induire la synthèse d'anticorps spécifiques.

En général, les molécules de poids moléculaire inférieur à 5000 Daltons sont peu ou pas immunogènes. Elles sont incapables de provoquer à elles seules la synthèse d'anticorps. Cependant, lorsqu'elles sont conjuguées à une protéine transporteuse de haut poids moléculaire, elles peuvent néanmoins stimuler la synthèse d'anticorps leur étant spécifiques. On donne à ces

composés le nom d'haptènes. Les haptènes sont alors des composés non immunogènes mais capables de réagir sous forme libre avec les anticorps qui leur sont spécifiques, une fois qu'on a réussi à les synthétiser. Certaines drogues, hormones et toxines, pesticides, de même que certaines vitamines, entrent dans cette catégorie de composés (Rittenburg, 1990).

### 1.3.2.2 Anticorps

Les anticorps sont des protéines globulaires, communément appelées immunoglobulines (Ig). Il en existe 5 classes (IgA, IgG, IgE, IgM, et IgD). Parmi celles-ci la classe des IgG est la plus importante en terme de quantité. Les IgG représentent 80% de toutes les immunoglobulines. La structure d'un anticorps de la classe des IgG est présentée à la figure 1.4. Chaque molécule est formée de la combinaison de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes, réunies entre elles par des ponts disulfures. On distingue deux régions dans la structure des IgG: celle dont la composition est invariable à l'intérieur d'une même classe d'immunoglobulines et celle responsable de la reconnaissance spécifique d'un épitope.



**Figure 1.4** - Structure des immunoglobulines IgG.

Les immunoglobulines peuvent être produites de façon spontanée par l'organisme. Il s'agit d'un moyen de défense très efficace contre les agressions extérieures. Ces mêmes immunoglobulines peuvent également être produites de façon expérimentale par l'injection de substances étrangères à l'organisme. Selon la stratégie utilisée pour produire ces immunoglobulines, on parle d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

#### ***- Anticorps polyclonaux***

Pour préparer des anticorps polyclonaux, des animaux, le plus souvent des lapins, des moutons ou des chèvres, subissent une série d'injections selon une fréquence préétablie. La substance injectée, l'antigène, est celle contre laquelle on souhaite récolter des anticorps spécifiques. Pour que sa présence stimule la synthèse d'anticorps, elle doit apparaître à l'organisme hôte comme une menace. Si elle est trop apparentée à une de ses propres molécules, la substance injectée sera incapable de stimuler le système immunitaire de l'animal.

L'immunisation d'un animal et la collecte de son sérum sanguin mèneront donc à l'obtention d'un mélange complexe d'anticorps, on parle alors d'anticorps polyclonaux. En injectant le même antigène à un animal à intervalles réguliers, on arrive à amplifier la réaction immunitaire et à induire une synthèse de plus en plus importante et rapide d'anticorps dans son sérum. Pour récupérer ces anticorps, le sang de l'animal est prélevé et débarrassé des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes sanguines. Le sérum ainsi obtenu est par la suite purifié, si nécessaire, par différentes techniques dans le but d'en isoler les immunoglobulines spécifiques (Rittenburg, 1990).

#### ***- Anticorps monoclonaux***

Les anticorps monoclonaux sont produits, comme leur nom l'indique, par des clones d'une seule et unique cellule de lymphocyte B. Ils possèdent pour cette raison une spécificité et une affinité semblables en tout point, car les clones sécrètent tous le même anticorps.



On obtient les anticorps monoclonaux en immunisant un animal, généralement une souris, par des injections de l'antigène à analyser et en récupérant par la suite, après sacrifice de l'animal, les cellules de sa rate et en les fusionnant avec des cellules cancéreuses. Les cellules obtenues de cette fusion s'appellent hybridomes. L'hybridome est doté, comme les cellules cancéreuses, de la capacité de se reproduire indéfiniment mais également de celle de produire des anticorps tout comme les cellules de lymphocytes B.

Quand l'hybridome croît, il sécrète ses anticorps dans le milieu de culture. Chaque milieu de culture, où se reproduisent inlassablement les cellules issues d'une même lignée de lymphocytes, est ensuite testé sur la base de l'affinité des anticorps. Les hybridomes caractérisés par la présence des anticorps qui possèdent le plus d'affinité pour l'antigène à doser sont sélectionnés. Plus l'affinité pour les antigènes correspondants est grande, plus la méthode immuno-chimique est sensible. De même, plus la spécificité pour l'antigène est élevée, plus la méthode est spécifique (Rittenburg, 1990).

### 1.3.3 Différents formats de tests immunologiques

Il existe différents types d'essais immunologiques selon la façon de visualiser et de quantifier la réaction antigène-anticorps. Les essais immunologiques s'effectuent sur des supports aux formes variées, par exemple des plaques de microtitration, des bâtonnets, des matrices absorbantes (nitrocellulose, nylon) ou des tubes. Les plaques de microtitration, très populaires, sont de petites plaques de matière plastique où sont disposés de façon régulière, de nombreux petits puits, en général au nombre de 96. Les solutions d'antigène et d'anticorps y sont déposées. Malgré la diversité des supports sur lesquels sont effectués les essais immunologiques, ceux-ci n'exigent toutefois, que l'utilisation de très peu de réactifs. Les antigènes et les anticorps et certains composés destinés à détecter la réaction constituent, en effet, l'ensemble des réactifs nécessaires en immuno-chimie.

Les essais immunologiques visent à détecter et/ou à quantifier soit des antigènes, soit des anticorps. La plupart des essais immunologiques d'usage courant sont rapides et économiques.

Ils sont très sensibles grâce à l'utilisation de marqueurs appropriés pour la réaction. Ils sont aussi, bien entendu, très spécifiques, une spécificité conférée par la relation de complémentarité entre un antigène et son anticorps. Ils allient facilité d'exécution et simplicité d'interprétation, car basés, le plus souvent, sur l'utilisation d'enzymes pour amplifier la réaction immunitaire et en indiquer la présence par le développement d'une simple coloration.

On distingue deux groupes de techniques de détection : les méthodes directes et indirectes. Dans les méthodes directes, l'anticorps spécifique est purifié, marqué et utilisé pour détecter directement sa liaison à l'antigène. Dans une méthode indirecte, l'anticorps n'est pas marqué et n'a pas à être purifié. Sa liaison à l'antigène est mise en évidence au moyen d'un second réactif, par exemple un anticorps anti-immunoglobuline. Le choix entre les méthodes directes et indirectes dépend des conditions expérimentales. L'utilisation d'anticorps directement marqués implique moins d'étapes, pose moins de problèmes de bruit de fond mais est souvent moins sensible que les méthodes indirectes. Elles nécessitent en outre une nouvelle étape de marquage pour étudier chaque anticorps ou tester chaque nouvelle méthode de marquage. Au contraire, les méthodes indirectes présentent l'avantage d'impliquer des réactifs marqués très facilement disponibles. Les mêmes réactifs peuvent être utilisés pour déceler un grand nombre d'antigènes différents vendus commercialement. Par ailleurs, l'anticorps primaire n'est pas modifié, de sorte que ses propriétés (spécificité et affinité) ne risquent pas d'être modifiées. En conséquence, ce sont les méthodes indirectes qui sont le plus souvent utilisées (Harlow and Lane, 1988).

Les techniques utilisant des réactifs marqués sont les plus populaires en raison de leur grande sensibilité. Elles s'avèrent très utiles lorsque la quantité d'antigènes dans l'échantillon est très faible. L'utilisation du marqueur sert à amplifier et à révéler la réaction principale. Les marqueurs sont greffés à la molécule d'antigène ou à la molécule d'anticorps par l'intermédiaire d'un lien covalent. Ce sont le plus souvent soit des isotopes radioactifs menant à des essais radioimmunologiques, soit des enzymes menant à des essais immunoenzymatiques (Rittenburg, 1990). On retrouve également les marquage à l'or colloïdal et aux billes de latex colorées.

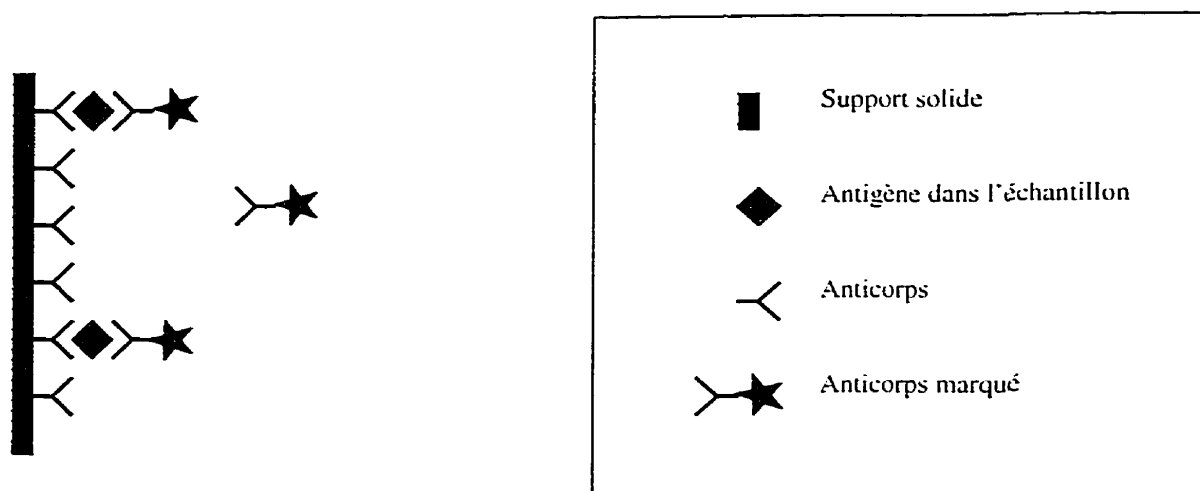
Les techniques utilisant des enzymes comme marqueurs sont moins coûteuses en terme de réactifs et d'équipements de mesure que les techniques utilisant les isotopes radioactifs. Les enzymes sont plus stables que les radio-isotopes et ne nécessitent pas de précautions particulières comme lorsque des composés radioactifs sont manipulés. La limite de détection qui peut être atteinte avec chacune des deux techniques est à peu près équivalente. Elle est, en général, de l'ordre du nanogramme par millilitre et peut atteindre parfois le picogramme.

En phase homogène et hétérogène, les trois schémas réactionnels les plus courants reposent sur les principes suivants:

- Double capture utilisant des anticorps marqués (techniques sandwich);
- Compétition directe utilisant les antigènes marqués;
- Compétition indirecte utilisant des anticorps marqués.

### **1.3.3.1 Principe de double capture**

La figure 1.5 présente le schéma réactionnel en double capture utilisant des anticorps marqués à la base des techniques non compétitives. L'antigène à doser est mis en présence d'anticorps préalablement immobilisés sur un support solide et disponibles en excès. Après la réaction antigène-anticorps, un deuxième anticorps marqué est ajouté. Ce deuxième anticorps réagit à son tour avec le même antigène. Une fois la réaction complétée, l'excès d'anticorps marqué est éliminé par une série de rinçage et le complexe ainsi formé est révélé. Le type de révélation dépendra du type de marqueur utilisé. Le signal obtenu est directement proportionnel à la quantité d'antigène dans l'échantillon analysé.



**Figure 1.5** – Principe d'un test en double capture avec anticorps marqué (sandwich).

En double capture, comme la molécule d'antigène doit réagir, à la fois avec l'anticorps lié et avec l'anticorps marqué, elle doit posséder au moins deux sites de liaison accessibles. Les techniques basées sur ce principe ne peuvent par conséquent être utilisées pour doser les petites molécules montrant un seul site antigénique. Exploiter deux sites de liaison offre néanmoins l'avantage de conférer au dosage une bonne spécificité.

### 1.3.3.2 Principe de compétition directe avec des antigènes marqués

La figure 1.6 illustre le principe de compétition avec des antigènes marqués. Des antigènes marqués en quantité connue et des antigènes qui proviennent de l'échantillon à analyser sont mélangés et mis en présence d'une quantité déterminée d'anticorps préalablement immobilisés sur un support solide. Les antigènes marqués et non marqués entrent alors en compétition pour occuper les sites de fixation disponibles. Après rinçage du support et révélation de la réaction, le signal obtenu est inversement proportionnel à la quantité d'antigènes présente dans l'échantillon analysé. Si l'échantillon ne contient pas d'antigènes, tous les anticorps sont occupés par des molécules marquées, le signal est à son maximum. À l'inverse, si l'échantillon contient une grande quantité d'antigènes, très peu de molécules marquées peuvent se fixer sur

les anticorps. Il est donc possible de construire une courbe de calibrage d'intensité du signal en fonction de la quantité d'antigènes non marqués dans le milieu.

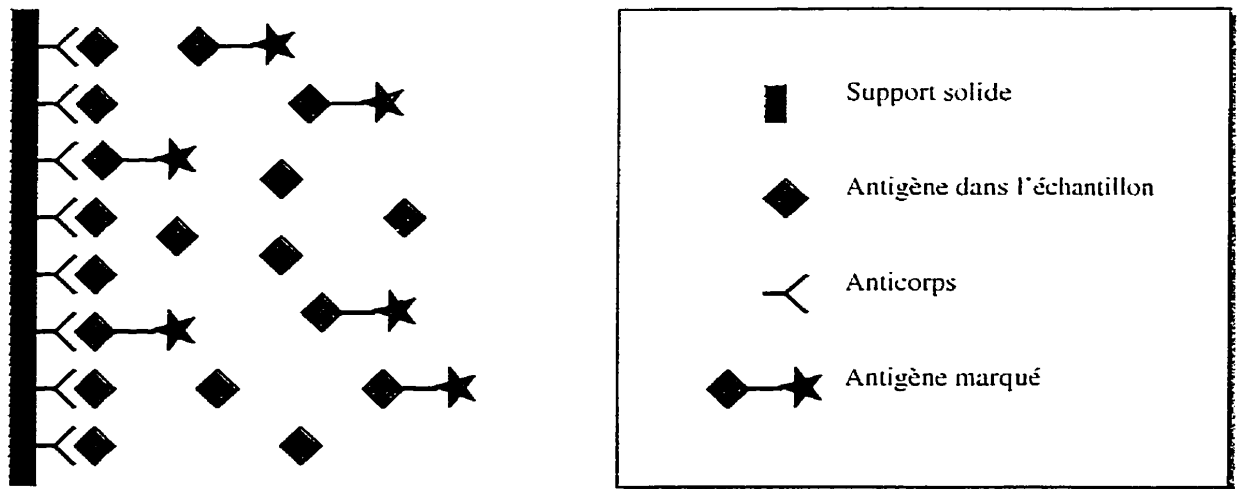
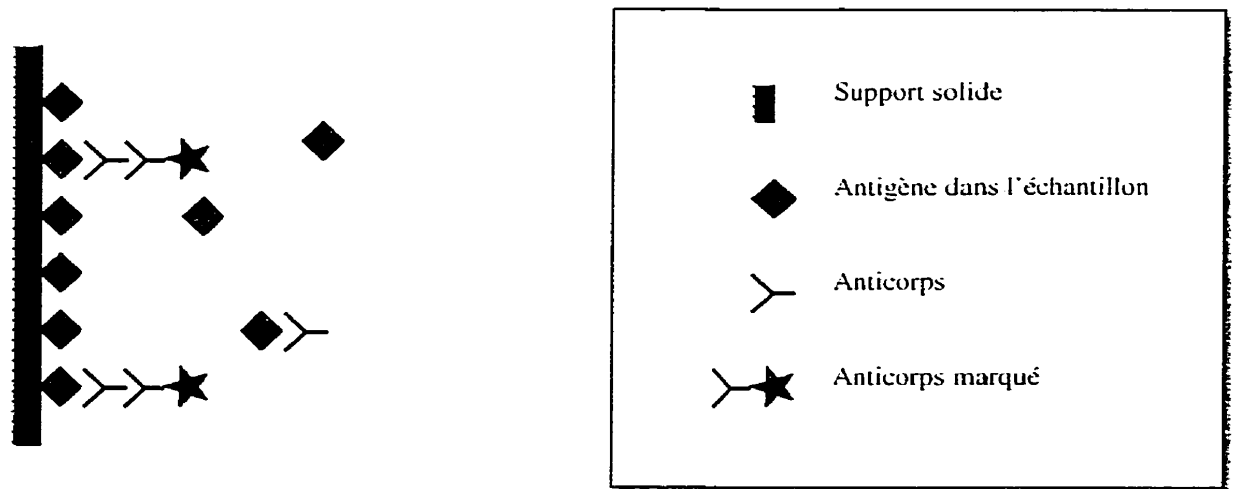


Figure 1.6 – Principe d'un test compétitif direct utilisant des antigènes marqués.

### 1.3.3.3 Principe de compétition indirecte avec des anticorps marqués

Pour contourner l'obligation d'utiliser des réactifs en excès, les méthodes compétitives utilisant des anticorps marqués ont été proposées. Le principe en est illustré à la figure 1.7. L'antigène libre contenu dans l'échantillon à analyser est mis en présence d'anticorps marqués. Après quelques minutes d'incubation, le mélange est ajouté à un support préalablement couvert du même antigène purifié. Après une deuxième incubation, la réaction entre les anticorps demeurés libres dans l'échantillon de départ et l'antigène est révélée. Comme pour le test précédent, le signal obtenu est inversement proportionnel à la quantité d'antigène contenue dans l'échantillon à analyser.



**Figure 1.7-** Principe d'un test compétitif indirecte utilisant des anticorps marqués.

#### 1.3.4 Applications des essais immunologiques en analyse des aliments

Le choix d'un essai immunologique donné dépend du but de l'analyse, de la disponibilité des réactifs et équipements, de la sensibilité et de la précision recherchées ainsi que de la rapidité avec laquelle une réponse doit être fournie.

Les applications des essais immunologiques sont nombreuses en analyse des aliments. On les réserve, en général, à la détection et à la détermination de composés en quantité très faible dans les aliments ou encore pour une analyse nécessitant une grande spécificité. On utilise les essais immunologiques pour détecter les cas d'adultération de la viande et du lait et pour vérifier l'identité d'espèces de poissons. Des toxines, des hormones, des pesticides, des antibiotiques, des facteurs antinutritionnels et des vitamines peuvent aussi être détectés par essais immunologiques. De plus en plus de tests immunochimiques sont effectués en microbiologie pour détecter la présence d'organismes pathogènes, de toxines microbiennes ou de bactériophages (Rittenburg, 1990).

## **1.4 Hypothèse et objectifs**

### **1.4.1 Hypothèse**

Des récentes observations sur l'intoxication ou la carence en vitamine D ont conduit à des questions concernant la quantité réelle de vitamine D ajoutée dans le lait et les produits laitiers fortifiés. Une récente enquête, conduite au Canada et aux États-Unis, a clairement montré que le lait et les formules pour nourrissons contiennent rarement la quantité de vitamine D indiquée sur l'étiquette. Les échantillons de lait peuvent être soit sousfortifiés ou soit surfortifiés. Les deux cas sont nuisibles pour l'humain. Un meilleur contrôle du procédé de fortification est donc nécessaire. Les méthodes traditionnelles utilisées pour la quantification de la vitamine D ne sont pas assez sensibles et spécifiques. Elles sont de plus très compliquées à exécuter exigeant des étapes de saponification et d'extraction difficiles et longues. De plus, ces méthodes sont coûteuses en terme de temps et de ressource et sont donc inconcevables pour une utilisation routinière.

Durant ce projet, nous avons émis l'hypothèse suivante: le couplage de la vitamine D à une molécule transporteuse telle que la BSA rendra cette molécule suffisamment immunogène pour produire des anticorps spécifiques. Les anticorps produits pourront alors être utilisés pour le développement de tests immunoenzymatiques qui serviront à la détection et à la quantification de la vitamine D dans des échantillons d'aliments fortifiés.

### **1.4.2 Objectifs**

L'objectif général de ce travail est donc de mettre au point une méthode plus adéquate et plus précise pour la quantification de la vitamine D dans le lait et les produits laitiers fortifiés et ainsi prévenir les problèmes de santé liés à une carence ou un excès de consommation de cette vitamine.

Les objectifs spécifiques délimitant les différentes étapes du projet sont :

- 1- Établir une stratégie moléculaire pour le couplage de la vitamine D à une molécule transporteuse et la rendre ainsi plus immunogène. Le complexe obtenu sera utilisé pour produire des anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre la vitamine D.
- 2- Développer et optimiser un test immunoenzymatique de type ELISA compétitif pour la détection et la quantification de la vitamine D.



## 1.5 RÉFÉRENCES

**Agrawal, V.K.** (1987) Liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milk. *J. AOAC*, 71: 19-24.

**Anonyme** (1990) *Official Methods of Analysis 15<sup>th</sup> Ed.*, AOAC, Arlington, VA.

**Booher, L.E., Hartzler, E.R. et Hewston, E.M.** (1947) U.S. Department of Agriculture Circular 638.

**Chen, T.C., Heath, H. et Hollick, M.F.** (1993) An update on the vitamin D content of fortified milk from United States and Canada. *N. Engl. J. Med.*, 329: 1507.

**Cottrel, R.C.** (1988) Milk and milk products unbalanced diet, *J. Society Dairy Tech.*, 41: 95-109.

**Deluca, H.F.** (1978) *Handbook of Lipid Research*, vol 2, Fat soluble vitamins, Plenum Press, New York, USA. p. 69.

**Hagar, A.F., Madsen, L., Wales, L. Jr et Bradford, H.B. Jr** (1993) Reversed-phase liquid chromatographic determination vitamin D in milk. *J. AOAC Inter.*, 77: 1047-1051.

**Harlow, E. et Lane, D.** (1988) *Antibodies : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.

**Hasegawa, H.** (1992) Vitamin D determination using high-performance liquid chromatography with internal standard-redox mode electrochemical detection and its application to medical nutritional products. *J. Chromato.*, 6095: 215-220.

**Hollick, M.F, Shao, Q., Lui, W.W et Chen, T.C.** (1992) The vitamin D content of fortified milk and infant formula. *N. Engl. J. Med.*, 326: 1178.

**Hollis, B.W.** (1986) Assay of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D involving a novel single-cartridge extraction and purification procedure. *Clin. Chem.*, 32: 2060-2063.

**Jacobus, C.H., Holick, M.F., Shao, Q., Chen, T.C., Holm, I.A., Kolodny, J.M., Fuleihan, G.E.H. et Seely, E.W.** (1992) Hypervitaminosis D associated with drinking milk. *N. Engl. J. Med.*, 326: 1173-1177.

**Machlin, L.** (Ed). (1991) *Handbook of vitamins*, 2<sup>nd</sup> Edition, Marcel Dekker, New York, USA, p. 59.

**McKenna, M.J.** (1992) Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly. *Am. J. Med.*, 93: 69-77.

**Parfitt, A.M.** (1990) Avioli LV Krane, editors, *Metabolic bone disease and clinically related disorders*. 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia, USA, 329: 96.

**Reichel, H., Koeffler, H.P. et Norman, A.W.** (1989) The role of vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.*, 320: 980-991.

**Renken, S.A. et Warthesen, J.J.** (1993) Vitamin D stability in milk. *J. Food Sci.*, 58: 552-556.

**Rittenburg, J.H.** (Ed.)(1990) *Development and application of immunoassay for food analysis*. Elsevier Applied Science, New York, USA, 259 p.

**Sliva, M.G., Green, A.E., Sanders, J.K., Euber, J.R. et Saucerman, J.R.** (1992) Reversed-phase liquid chromatographic determination of vitamin D in infant formulas and enteral nutritionals. *J. AOAC Int.*, 75: 566-571.

**Van Denberg, H., Boshuis, P.G. et Schreurs, W.H.P.** (1986) Determination of vitamin D in fortified and non-fortified milk powder and infant formula using a specific radioassay after purification by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 34: 264-268.

**Webb, A.R., Pilbeam, C., Hanafin, N. et Holick, M.F.** (1990) An evaluation of the relative contributions of exposure to sunlight and of diet to the circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D in an elderly nursing home population in Boston. *Am. J. Clin. Nutr.*, 51: 1075-1081.

**Webb, A.R., Kline, L. et Holick, M.F.** (1988) Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D<sub>3</sub>: Exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D<sub>3</sub> synthesis in human skin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67: 373-378.

**Yendt, E.R.** (1994) Vitamin D and osteoporosis. *Nutrition Quarterly.*, 18 : 87-92.

## **CHAPITRE 2**

**La production et la caractérisation d'anticorps polyclonaux  
dirigés contre  
le cholecalciférol (vitamine D<sub>3</sub>).**

**Production and Characterization of Polyclonal Antibodies  
against Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>).**

Julie Jean, C. Turcotte, R.E. Simard and I. Fliss

Accepté dans Journal of Immunological Methods.

## RÉSUMÉ

La vitamine D est une vitamine essentielle pour le fonctionnement normale et la croissance des êtres humains. Au Canada et aux États-Unis, le lait et les produits laitiers fortifiés sont des sources essentielles de vitamine D. L'apport nutritionnel recommandé de vitamine D pour un adulte est de 200 à 400 UI par jour. Des quantités additionnelles de vitamine D ne sont pas bénéfiques et peuvent même être toxiques. De même, une carence en vitamine D peut mener à une absorption inadéquate du calcium et du phosphore et à une mauvaise minéralisation des os et des dents.

Les méthodes actuelles pour le dosage de la vitamine D dans le lait sont limitées en terme de sensibilité, de rapidité et de simplicité.

L'objectif de cette étude était de développer une nouvelle stratégie pour une quantification précise de la vitamine D dans le lait fortifié. Afin d'atteindre cet objectif, des anticorps spécifiquement dirigés contre la vitamine D ont été produits chez des lapines utilisant la cBSA comme protéine transporteuse. Les anticorps anti-vitamine D sont obtenus à partir du sérum des lapines après des purifications successives sur Protéine A/G-Agarose, cBSA-Sépharose et cOVA-vitamine D-Sépharose. Bien que les rendements en anticorps anti-vitamine D sont relativement faibles, les anticorps obtenus montrent une très haute spécificité et affinité à la vitamine D. Ces anticorps ont été utilisés pour développer un test immunoenzymatique en phase solide capable de détecter jusqu'à 35 ng de vitamine D en 3 heures seulement. Le signal obtenu est proportionnel à la quantité de vitamine D présente dans l'échantillon analysé.

La stratégie développée dans cet article paraît très prometteuse en terme de sensibilité, de rapidité et de simplicité. Elle offre un grand potentiel pour l'automatisation et l'utilisation en analyse de routine pour la quantification de la vitamine D dans lait et les autres produits fortifiés.

## ABSTRACT

Vitamin D is one of the essential vitamins in the human diet for normal growth and function. In Canada and the USA, fortified milk and milk products are the essential source of vitamin D. The adult recommended nutrient intake of vitamin D is 200 to 400 I.U. (corresponding to 5 to 10  $\mu\text{g}$ ) per day. Additional amounts of vitamin D do not confer benefits and may even be toxic. However, a deficiency of this vitamin leads to inadequate absorption of calcium and phosphorus and faulty mineralization of bones and teeth. Actual methods for measuring vitamin D in milk are limited in terms of sensitivity, rapidity and simplicity.

The objective of this study was to develop a new molecular strategy for the production, purification and characterization of polyclonal antibodies to vitamin D. Specific antibodies were raised in rabbits against vitamin D using cationized bovine serum albumin (cBSA) as a carrier protein. Anti-vitamin D antibodies were recovered from rabbit sera by sequential affinity chromatographies through Protein A/G Agarose, cBSA Sepharose and cOVA-vitamin D Sepharose columns. Although the yields of anti-vitamin D were relatively low, recovered antibodies showed high specificity and affinity to vitamin D. The purified antibody was used to develop a solid-phase enzyme immunoassay in order to determine the exact concentration of vitamin D in phosphate buffer. Using this immunoassay, approximately 35 ng of vitamin D can be detected within 3 h. The signal obtained was proportional to the amount of vitamin D in the analyzed sample.

The strategy developed in this paper appears to be very promising in terms of sensitivity, rapidity and simplicity. It offers a great potential for automation and use on a routine basis for the quantification of vitamin D in fortified milk and other milk products.

## 2.1 INTRODUCTION

Vitamin D is a group of chemically distinct sterol compounds playing a major role in the matrix of cartilage and bones (Reichel et al., 1989). Natural foods are poor in vitamin D. The only sources of vitamin D are exposure to sunlight, commercial vitamin-D preparations, and particularly, fortified foods. About 85% of fresh milk and almost all evaporated milk are fortified with vitamin D in Canada and in the United States (Webb et al., 1990). Milk is especially suitable for fortification since vitamin D facilitates the absorption of the calcium and phosphorus it contains.

The recommended dose of vitamin D for an adult is 200 to 400 I.U. (correspond to 5 to 10  $\mu\text{g}$ ) per day (Yendt, 1994). Additional amounts of vitamin D do not confer greater benefits and are even toxic for human (Cottrel, 1988). Patients with vitamin D intoxication show various clinical symptoms including loss of weight with anorexia, constipation and vomiting. Complications of hypercalcemia can occur leading to a general bone pain and kidney stones (Jacobus et al., 1992). Vitamin D deficiency is also hazardous and can lead to rickets in children, which is characterized by bone softening and a lack of muscle tone, and to osteomalacia in adults, which is characterized by spontaneous multiple fractures (Parfitt, 1990).

Recent outbreaks of vitamin D intoxication and deficiency have led to questions about the real level of vitamin D in fortified milk and some milk products. According to a recent survey conducted in Canada and United States, milk and infant formula preparations rarely contain the amount of vitamin D stated on the label (Cottrel, 1988; Holick et al., 1992). Chen et al. (1993) reported that 80% of milk samples purchased in the United States contained either 20% less or 20% more than the label claimed. The results in milk samples purchased in Canada showed that 73% of samples did not contain 80 to 120% of the amount of vitamin D claimed. Fourteen percent of samples had no detectable vitamin D and one sample of whole milk contained 363% of the amount stated on the label.

In recent years, much research has been devoted to developing reliable methods for the determination of fat-soluble vitamins in foods. The determination of vitamin D in milk and milk

products causes particular technical difficulties because of the presence of excessive amounts of fats, proteins and sterols including cholesterol in the food matrix. Some of these compounds have similar chemical and physical properties and could interfere with the analysis (Agarwal, 1987). In addition, vitamin D was shown to be sensitive to heat, light and oxidation, which cause a significant loss during the extraction, and cleaning steps (Renken and Warthesen, 1993).

Analytical chemistry methods are widely used in the detection of vitamin D and other vitamins in milk and milk products. Despite their precision with a recovery range of 93-98%, these methods, including both gas and liquid chromatography, remain expensive in terms of equipment and time-consumption due to the saponification, extraction, cleanup, collection and concentration steps (Sliva et al., 1992).

The development of more rapid, reliable, inexpensive, highly specific and user-friendly alternative methods is needed for a better quantification of vitamin D in fortified milk and milk products. Immunological methods using monoclonal or polyclonal antibodies represent one of these alternatives. In this paper, the possibility of applying this immunological strategy for the specific and sensitive detection of vitamin D was investigated through an enzyme immunoassay using specific polyclonal antibodies.

## **2.2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.2.1 Preparation of antigen**

Vitamin D is a small antigen with a molecular weight of 384 Dalton. To increase its immunogenicity, vitamin D (cholecalciferol, vitamin D<sub>3</sub>) (Sigma, St-Louis, MO) was linked to Bovine Serum Albumin (BSA) (Pierce, Rockford, IL). Since vitamin D does not have any usual conjugation groups such as carboxylic or amino groups, a two-step strategy was used to link this molecule to BSA. The basis of this strategy is shown in Fig. 2.1. The first step corresponds to a modification of BSA carboxylic groups to generate a cationized protein with a



high isoelectric point. The carboxylic groups were then modified to form aminoethylamide side chains. The abundance of primary amines on cBSA makes it a very willing participant in the second step. The second step is an aminoalkylation reaction during which amine moieties of cBSA were linked to vitamin D through an active hydrogen (Fig. 2.1).

### 2.2.2 Cationization

Cationization was carried out according to a modification of the method of Border et al. (1982) using 1-ethyl-3-[(3-methylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride] (EDC) (Aldrich, Milwaukee, WI) as coupling agent and ethylenediamine (EDA) (Aldrich, Milwaukee, WI) as linker. Two mg of BSA were first dissolved in 200  $\mu$ l of conjugation buffer (0,1M MES [2-(N-Morpholino)-ethanesulfonic acid], 0,15 M NaCl, pH 4,7) and then added to 500  $\mu$ l of the same buffer containing different quantities of EDA (1, 6, 12, 24, 48 and 72 mg) and EDC (0,72, 5 and 10 mg). This mixture was incubated with continuous stirring for 2 h at room temperature. The efficiency of the cationization reaction was monitored by a native 10% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis with solutions, according to Davies (1964) but running in reversed polarity. Electrophoresis was performed at constant current (20 mA) for 4 h, and gel was stained for 30 min with 0,1% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad, Richmond, CA).

### 2.2.3 Conjugation reaction

Conjugation of vitamin D to cBSA was carried out by a modified method of Ranadive and Sehon (1967). Briefly, 200  $\mu$ g of cBSA was dissolved in 200  $\mu$ l of conjugation buffer and added to vitamin D (1 mg in 50  $\mu$ l 95% ethanol) in the presence of 50  $\mu$ l of 37% formaldehyde. The conjugation reaction was performed for 4 h at 37°C with gentle agitation. The cBSA-vitamin D complex was then purified by size-exclusion chromatography and 1,0 ml fractions were collected and monitored by absorbance measurements at 280 nm. Fractions with highest absorbance were pooled and concentrated to 1 ml using Centricon-30 (Amicon Inc., Beverly, MA) and then stored in aliquots at -20°C until use.

The efficiency of the conjugation reaction was verified by mid-infrared spectroscopy (Nicolet, magna-IR560, Madison, WI). Spectra of vitamin D alone, cBSA alone and cBSA-vitamin D complex were determined and compared in the region between 1000 and 1100  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **2.2.4 Production of anti-vitamin D antibodies**

Two New Zealand rabbits (Charles River, St. Constant, QC, Canada) were immunized by subcutaneous injections according to a standard protocol consisting of a first injection of 0,5 ml containing approximately 750  $\mu\text{g}$  of cBSA-vitamin D complex emulsified in complete Freund adjuvant followed by injections at three-week intervals of the same quantity of immunogen emulsified in incomplete Freund adjuvant. Blood samples were taken 7 days after each injection and tested by dot immunoassay for the presence of anti-vitamin D antibodies. This immune response was compared with that obtained from two other rabbits receiving vitamin D alone.

#### **2.2.5 Purification of specific anti-vitamin D antibodies**

All operations should be carried out at 4°C. The purification strategy used for the isolation of specific anti-vitamin D antibodies is illustrated in Fig. 2.2. This strategy involves three steps. In the first step, IgG fractions (FI) were recovered from rabbit serum by affinity chromatography using a Protein A/G Agarose column (Pierce, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions.

A second purification step was performed on a cBSA Sepharose column. The purpose of this step was to eliminate anti-cBSA antibodies. The cBSA Sepharose gel was prepared as follows: one gram of CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) was swollen and washed with 1mM HCl and then added to 5 ml of coupling buffer (0,1M  $\text{NaHCO}_3$ , 0,5 M NaCl, pH 8,3) containing 20 mg of cBSA. The coupling reaction was performed in a stopped vessel and rotated end-over-end overnight. The slurry was poured into a column of 1 cm diameter and the excess of ligand was washed away with 20 ml of coupling buffer. The remaining active groups were blocked with 0,1 M Tris-HCl buffer pH 8,0 for 2 h and then the

gel was washed by repeating three times the cycle of 20 ml of 0,2 M acetate buffer pH 4,0 containing 0,5M NaCl followed by 20 ml of 0,1 M Tris-HCl buffer pH 8,0 containing 0,5 M NaCl. The column was equilibrated with 20 ml of binding buffer (0,1M phosphate buffer pH 7,5 containing 0,5 M NaCl).

The IgG fraction (FI), diluted at approximately 1 mg/ml in 10 ml of binding buffer, was passed three times on the cBSA Sepharose column by recycling the unbound fraction (FII) recovered. Finally, anti-cBSA antibodies were eluted with 0,1 M glycine-HCl buffer pH 2,5. FII was further purified on cOVA-vitamin D Sepharose column.

The cOVA-vitamin D Sepharose column was prepared and performed as described before for cBSA Sepharose column. The bound fractions (FIII) were eluted and those with high absorbance pooled, extensively dialyzed against PBS and then concentrated using Centricon-30. This step was designed to purify and concentrate the specific anti-vitamin D antibodies.

#### **2.2.6 Dot immunoassay**

Serial dilutions of cBSA, cOVA, native BSA (nBSA) and native OVA (nOVA) starting at 6  $\mu\text{g/ml}$  and cBSA-vitamin D or cOVA-vitamin D complex starting at approximately the same concentration were prepared in PBS and then each dilution (100  $\mu\text{l}$ ) was dot-blotted on a nitrocellulose membrane (Micron Separations, Westboro, MA) using hydridot manifold (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada). The membrane was blocked for 1 h in 1% (w/v) blocking reagent (BR) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) and then incubated for 2 h at 37°C in the presence of PBS-0,5%BR containing purified anti-vitamin D antibodies at a final concentration of 1 to 10  $\mu\text{g/ml}$ . The membrane was washed 4 times in TBS containing 0,1% Tween 20 (TBS-T) and incubated again in the presence of an anti-rabbit-peroxidase conjugate diluted 1:2000 in PBS-0,5%BR. After being washed six times with a large volume of TBS-T, the membrane was reacted with a substrate solution containing 10 mg of 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, Saint-Louis, MO) in 15 ml TBS buffer and the color development was allowed to proceed until the maximum signal was obtained.

## **2.3 RESULTS**

### **2.3.1 Efficiency of the cationization reaction**

The efficiency of cationization of BSA was verified by a native 10% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis in reversed polarity (Fig.2.3). The efficiency of this cationization reaction depends on the concentration of EDA in the reaction mixture. As shown in Fig. 2.3, the highest migration rate was obtained with 48 mg of EDA. In this condition, the highest cationization yields were obtained generating a highly positively charged cBSA. At lower EDA concentrations, the efficiency of cationization decreased significantly. However, at high concentrations of EDA, no significant increase in cationization efficiency was obtained. On the other hand, varying the concentration of EDC between 0,72 to 10 mg does not seem to have any effect on the cationization efficiency (data not shown). Cationization efficiency obtained for OVA was similar to that obtained with BSA (data not shown). In this type of gel and under the described running conditions nBSA does not migrate (Fig. 2.3, lane 1).

### **2.3.2 Conjugation of vitamin D to cBSA**

After the conjugation reaction, the cBSA-vitamin D complex was purified by size-exclusion chromatography. The analysis of the recovered product in fraction 4 through 6 by mid-infrared spectroscopy in the region between 1000 and 1100  $\text{cm}^{-1}$  showed a characteristic waveband which was also obtained with vitamin D alone (1050  $\text{cm}^{-1}$ ) (Fig. 2.4). This waveband was not detected for cBSA. A similar spectroscopic profile was also obtained with cOVA-vitamin D complex (data not shown) confirming the efficiency of the conjugation protocol for the two carrier proteins used in this study.

### **2.3.3 Production of anti-vitamin D antibodies**

Immunized rabbits were bled seven days after each injection and were tested by dot immunoassay for their sensitivity and specificity to vitamin D. The nature of the immune

response is illustrated in Fig. 2.5 for both groups of rabbits (cBSA-vitamin D complex and vitamin D alone). According to this figure, only rabbits receiving cBSA-vitamin D complex produced specific antibodies to vitamin D (Fig. 2.5, lanes 1 and 2). When vitamin D alone was used, a weak signal was obtained after purification of the serum on Protein A/G Agarose column (Fig. 2.6, lane 3). However, this signal completely disappeared after a further purification on cBSA Sepharose column, even at a concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 2.5, lane 4).

When cBSA-vitamin D complex was used as immunogen, the signal increased until the 13<sup>th</sup> week after the first injection and then became stable (data not shown).

As shown in the material and methods section, a three-step purification strategy was used to purify anti-vitamin D antibodies. After Protein A/G column, recovered antibodies (FI) detect cBSA, cOVA, cBSA-vitamin D, cOVA-vitamin D and nBSA but not nOVA (Fig. 2.6, panel A, lanes 1 to 6). After purification on cBSA Sepharose column, the recovered antibodies (unbound fraction) (FII) reacted slightly with the cBSA-vitamin D complex. However, no signal was obtained with the other five antigens tested (data not shown). The weak signal obtained with cBSA-vitamin D complex is probably due to the fact that anti-vitamin D antibodies were in low quantity in comparison to the quantity of total unspecific immunoglobulins.

After the third purification step which consisted of the adsorption of anti-vitamin D antibodies on cOVA-vitamin D Sepharose matrix, a strong signal was obtained with cBSA-vitamin D complex and cOVA-vitamin D (Fig. 2.6, panel B). However, both native and cationized proteins did not give any signal confirming the specificity of the purified antibodies and the efficiency of the strategy adopted in this study.

To evaluate the yield of the anti-vitamin D antibodies produced, the concentration of each fraction (FI, FII and FIII) was determined and expressed in  $\mu\text{g/ml}$ . Anti-vitamin D antibodies, represent only 3,2% of total immunoglobulins whereas 40% of anti-cBSA was obtained.

## 2.4 DISCUSSION

Since vitamin D alone is not immunogenic, its conjugation to a carrier protein was the most critical step of the project. Common protocol used for the preparation of hapten-carrier complex could not be applied in this case due to the absence of a known coupling group such as  $\text{NH}_2$ ,  $\text{COOH}$  and  $\text{SH}$  on vitamin D. The use of active hydrogen groups remained a strategy for conjugating vitamin D to carrier proteins such as cBSA or cOVA. cOVA-vitamin D was used to screen anti-vitamin D antibodies since vitamin D alone could not be immobilized on nitrocellulose because of its hydrophobic character.

In the first step of this conjugation strategy and to maximize the number of vitamin D on the carrier protein, cationized protein was used. cBSA was prepared by substituting anionic chain carboxyl groups with aminoethyl amide groups. The resulting carrier protein is characterized by a higher isoelectric point (greater than 8,8).

The efficiency of the cationization reaction was greatly affected by the amount of EDA. An increase in EDA concentration in the cationization mixture resulted in high yields of cationization. However, it is important to mention that a high cationized level is not always advantageous. In this case, the number of vitamin D linked to carrier protein becomes too high resulting in a highly hydrophobic and consequently insoluble complex that is difficult to handle during both immunization and immunodetection. In this study, the conditions selected gave a highly soluble cBSA-vitamin D complex with a good conjugation yield.

Conjugation of vitamin D to cBSA was monitored by mid-infrared spectroscopy. This technique was selected for its sensitivity and specificity in detecting structural modifications in molecules. Vitamin D exhibits a characteristic waveband between 1000 and 1100  $\text{cm}^{-1}$  of the mid-infrared spectrum, which is attributed to the hydroxyl moieties of this molecule (1050  $\text{cm}^{-1}$ ). This waveband was also detected in the cBSA-vitamin D's spectrum however it was absent in that of cBSA. The difference between the characteristic vitamin D waveband and cBSA-

vitamin D's spectrum is probably due to the modification that occurs surrounding the hydroxyl groups during the conjugation reaction.

According to Fig. 2.5, only cBSA-vitamin D complex was able to generate a specific response in rabbits. This result was expected considering the low molecular-weight of vitamin D as immunogen (384 Da) and its very common molecular structure. However, cBSA-vitamin D antigen was shown to be very immunogenic generating at least three groups of immunoglobulins: anti-cBSA, anti-linker and anti-vitamin D. Our challenge in purifying anti-vitamin D was then the elimination of normal rabbit immunoglobulins, anti-cBSA and anti-linker antibodies. Since, 40% of anti-cBSA antibodies were produced, the cBSA Sepharose purification step became critical for eliminating the strong signal obtained against cBSA and BSA. This step seems to also eliminate antibodies directed against the linker between cationized carrier protein and vitamin D since the signal obtained with cOVA was completely eliminated after this step. After the last purification step on cOVA-vitamin D Sepharose column and at a concentration of 1  $\mu\text{g/ml}$ , a very weak signal was obtained with cBSA-vitamin D before the last purification step (data not shown). However, a strong signal was obtained after this step with cBSA-vitamin D and cOVA-vitamin D complexes (Fig. 2.6, panel B lanes 2 and 4).

In conclusion, this paper reports a very efficient strategy for the production of specific antibodies against small haptens like vitamin D. Conjugation to a cationized carrier protein appears to significantly enhance the immune response against such a small molecule. The multi-step purification strategy used for the purification of anti-vitamin D appears to be very effective and could be applied to other haptens.

The anti-vitamin D antibodies produced were successfully used to detect vitamin D in a solid-phase immunoassay. This provides an interesting tool for the detection and quantification of vitamin D in fortified food samples like milk and other dairy products. These antibodies are actually used to develop a microplate competitive enzyme immunoassay suitable for use on a routine basis for vitamin D analysis.

## 2.5 REFERENCES

- Agarwal, V.K.** (1987) Liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milk. *J. Assoc. Off. Anal.Chem.*, 71:19-24.
- Border, W.A., Harris, W.J., Kamil, E.S. and Cohen, A.H.** (1982) Induction of membranous nephropathy in rabbit by administration of an exogenous cationic antigen. Demonstration of a pathogenic role for electrical charge. *J. Clin. Invest.* 69:451-461.
- Chen, T.C., Heath, H. and Holick M.F.** (1993) An update on the vitamin D content of fortified milk from the United States and Canada. *N. Engl. J. Med.*, 329:1507.
- Cottrel, R.C.** (1988) Milk and milk products unbalanced diet. *J. Society Dairy Tech.*, 41 :95-109.
- Davis, B.J.** (1964) Disc electrophoresis II. Method and applications to human serum proteins *Ann. NY Acad. Sci.* 121 :404-427.
- Holick, M.F., Shao, Q., Lui, W.W. and Chen, T.C.** (1992) The vitamin D content of fortified milk and infant formula. *N. Engl. J. Med.*, 326:1178.
- Jacobus, C.H., Hollis, M.F., Shao, Q., Chen, T.C., Holm, I.A., Kolodny, J.M., Fuleihan, E.H. and Seely, E.W.** (1992) Hypervitaminosis D associated with drinking milk. *N. Engl. J. Med.*, 326:1173-1177.
- Muckerheide, A., Apple, R.J., Pesce, A.J. and Michael, J.G.** (1987) Cationization of protein antigens. I. Alteration of immunogenic properties. *J. Immunol.*, 138:833-837.
- Parfitt, A.M.** (1990) Metabolic bones disease and clinically related disorders. Avioli LV Krane, editors, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 329:96.



**Ranadive, N.S. and Schon, A.H.** (1967) Antibodies to serotonin. *Can. J. Biochem.* 45:1701-1710.

**Reichel, H., Koeffler, P. and Norman, A.W.** (1989) The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.*, 320 :980-991.

**Renken, S.A. and Warthesen, J.J.** (1993) Vitamin D stability in milk. *J. Food Sci.*, 58 :552-556.

**Sliva, M.G., Green, A.E., Sanders J.K., Euber, J.R. and Saucerman, J.R.** (1992) Reversed-phase liquid chromatographic determination of vitamin D in infant formulas and enteral nutritionals. *J. AOAC Int.* 75: 566-571.

**Webb, A.R., Pilbeam, C., Hanafin, N. and Holick, M.** (1990). An evaluation of the relative contribution of exposure to sunlight and of diet of the circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D in an elderly nursing home population in Boston. *Am. J. Clin. Nutr.*, 51:1075-1081.

**Yendt, E.R.** (1994). Vitamin D and osteoporosis. *Nutr. Quarterly.* 18:87-92.

## 2.6 FIGURES AND TABLES

**Figure 2.1** - Preparation of cationized BSA and cBSA-vitamin D conjugate.

**Figure 2.2** - Illustration of the three-step strategy used for the purification of specific anti-vitamin D antibodies.

**Figure 2.3** - Analysis of cBSA and nBSA by a native 10% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis in reversed polarity. Lane 1: nBSA. cBSA made with 2 mg BSA and 0,72 mg EDC and different concentrations of EDA. Lane 2; 72 mg EDA, Lane 3; 48 mg EDA, Lane 4; 24 mg EDA, Lane 5; 12 mg EDA and Lane 6; 6 mg EDA.

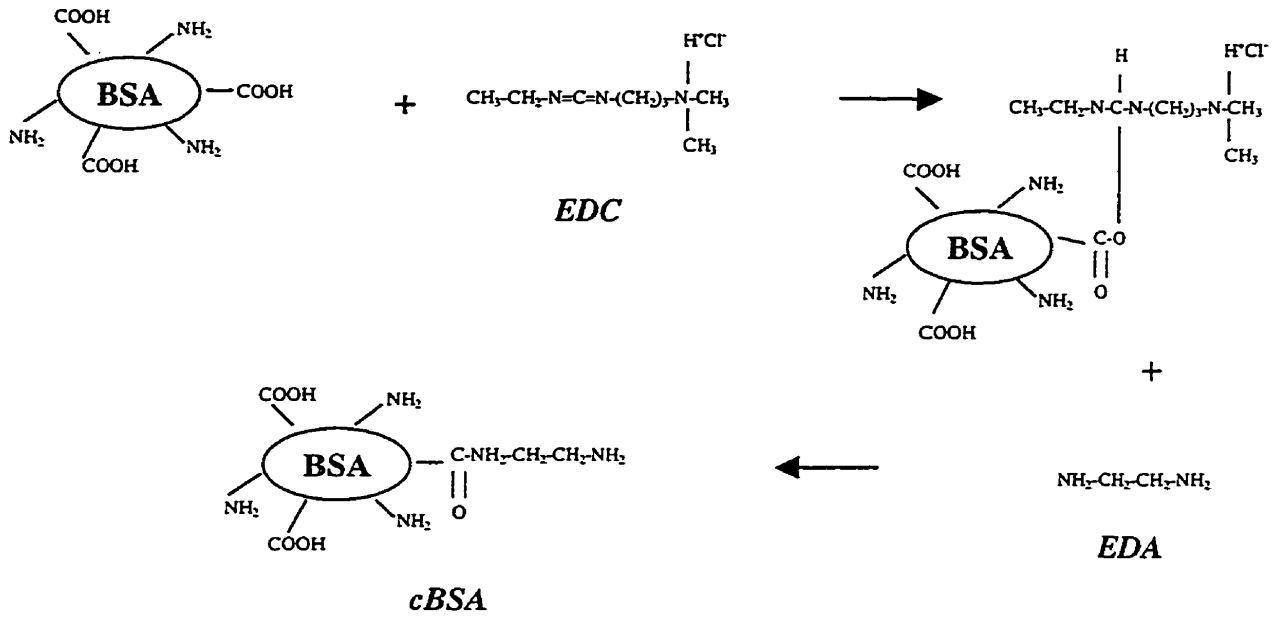
**Figure 2.4** - Analysis of the conjugation products by mid-infrared spectroscopy. Curve A; mid-infrared spectra of vitamin D. Curve B; mid-infrared spectra of cBSA-vitamin D complex and curve C; mid-infrared spectra of cBSA.

**Figure 2.5** - Immunogenicity of cBSA-vitamin D complex and vitamin D alone as determined by dot immunoassay. A conjugation reaction containing 2 mg of BSA and 1 mg vitamin D was performed as described above. The cBSA-vitamin D complex (2 mg BSA and 1 mg vitamin D) was serially diluted (1/300, 1/600, 1/1200, 1/2400, 1/4800 1/9600 and 1/19200) in PBS transferred on nitrocellulose and then reacted with different antibody solutions. Panel A; anti-serum from rabbit immunized with cBSA-vitamin D complex. Panel B; anti-serum from rabbit immunized with unconjugated vitamin D. Lane 1; antibodies obtained after purification on Protein A/G and Lane 2; antibodies obtained after purification on CNBr-cBSA. All antibodies were used at a final concentration of 10 µg/ml.

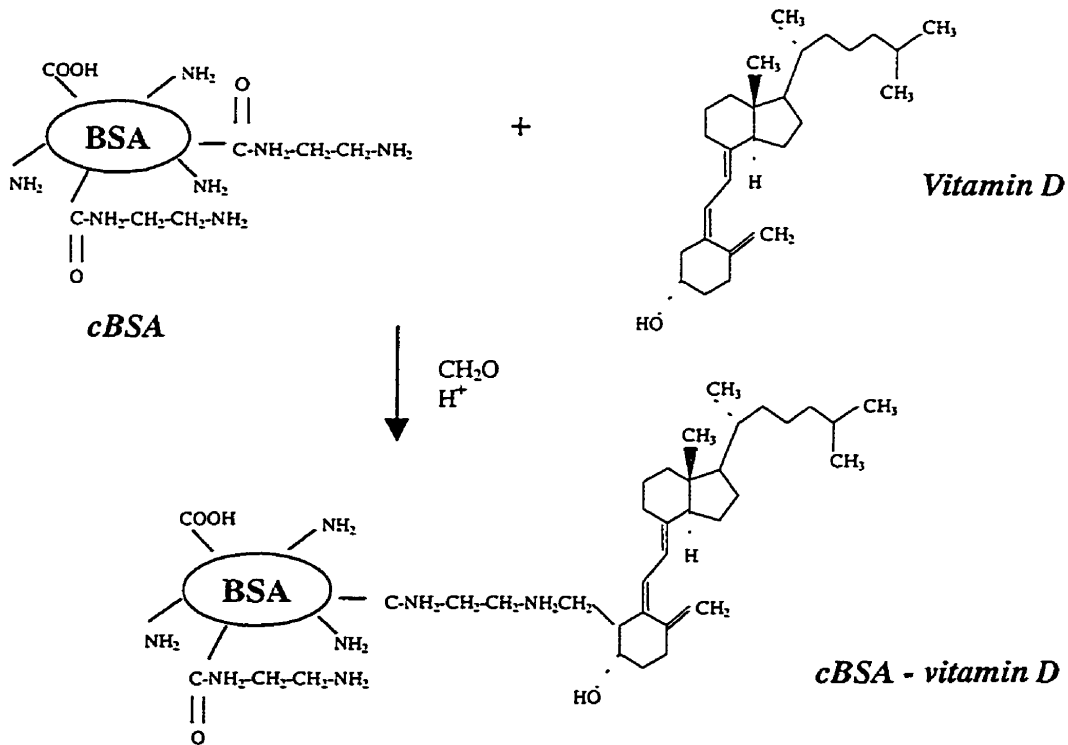
**Figure 2.6** - Variations of the specificity of the rabbit anti-serum as a function of purification steps. Anti-serum from rabbit immunized with cBSA-vitamin D complex was obtained after several injections and was submitted to the three-step purification protocol described in the

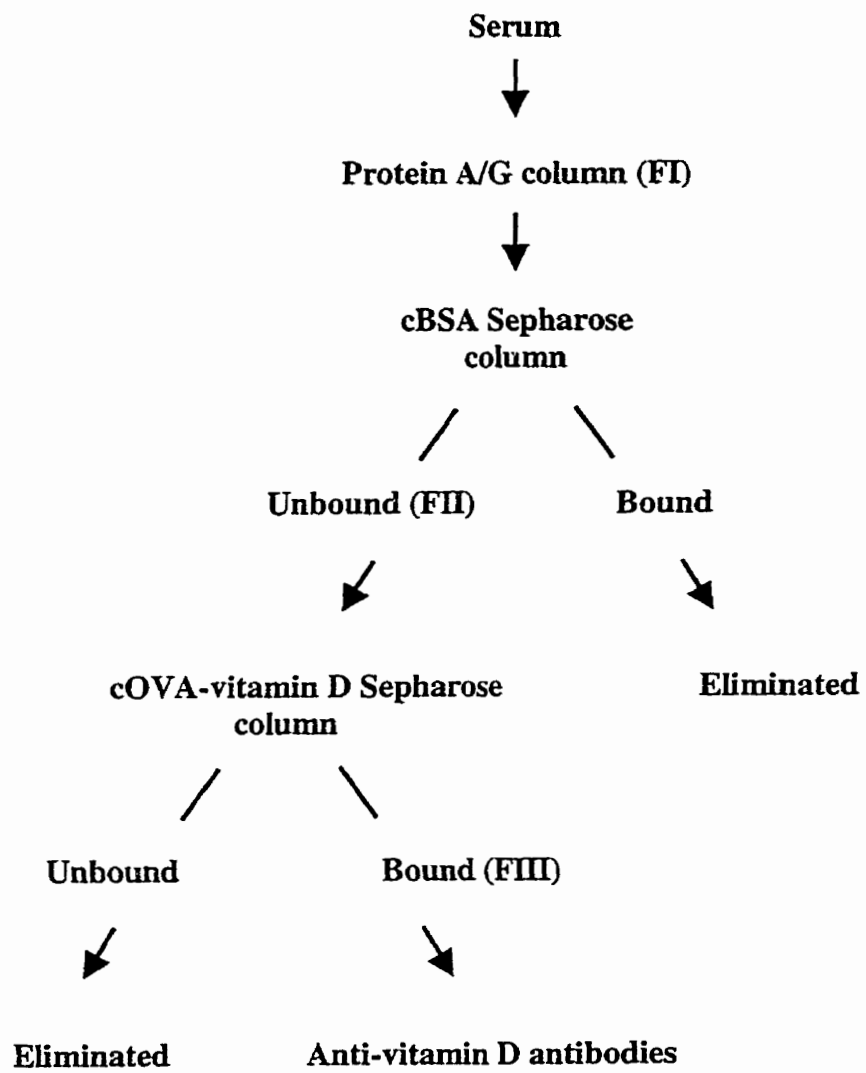
material and methods. A fraction of antibody solutions was sampled after each step and tested by dot immunoassay against several antigens. Panel A: Rabbit serum purified on Protein A/G column. Panel B: Rabbit serum purified on Protein A/G and cBSA Sepharose columns. Panel C: Rabbit serum purified on Protein A/G, cBSA Sepharose and cOVA-vitamin D Sepharose columns. For each panel, serial dilutions (6, 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.187, 0.093  $\mu\text{g/ml}$ ) of native and cationized protein were tested. For cBSA-vitamin D and cOVA-vitamin D serial dilutions (1/300, 1/600, 1/1200, 1/2400, 1/4800, 1/9600 and 1/19200) were prepared and tested using anti-vitamin D antibodies at a concentration of 1  $\mu\text{g/ml}$ . In all cases, position 8<sup>th</sup> was PBS. Lane 1: cBSA. Lane 2: cBSA-vitamin D. Lane 3: cOVA. Lane 4 : cOVA-vitamin D. Lane 5: nBSA and Lane 6: nOVA.

### STEP 1 - Cationization of BSA

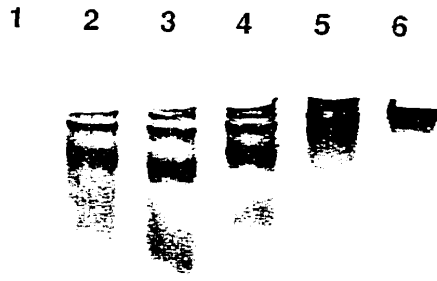


### STEP 2 - Coupling between vitamin D and cBSA

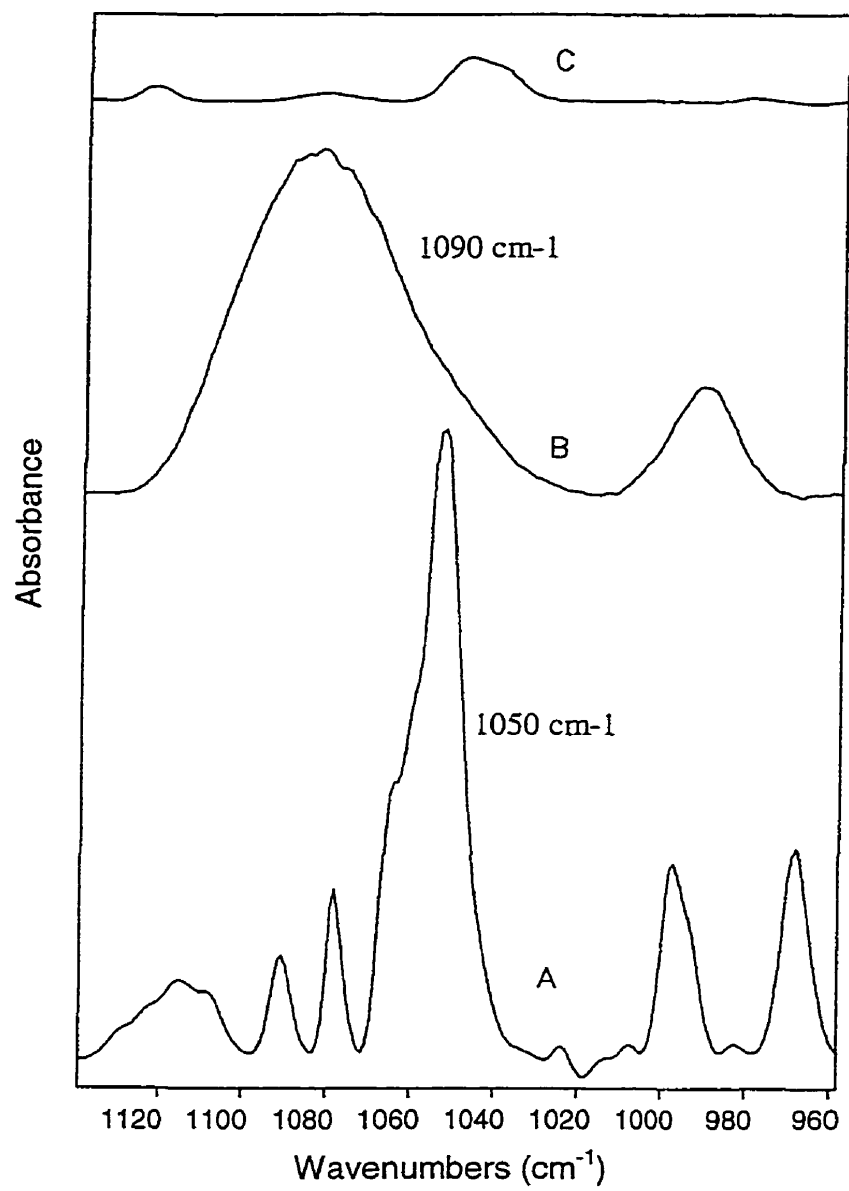


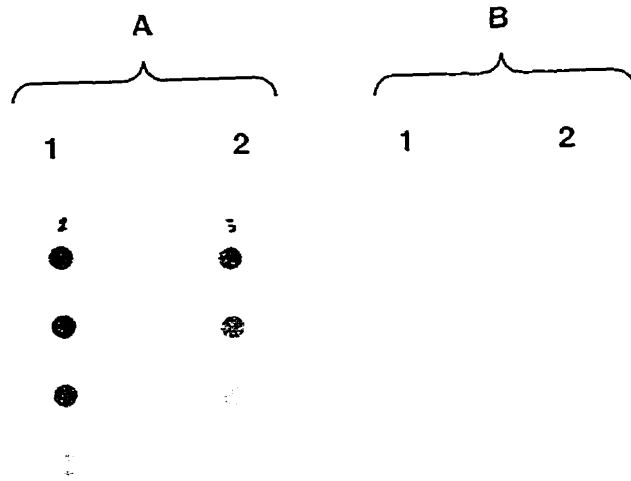


+

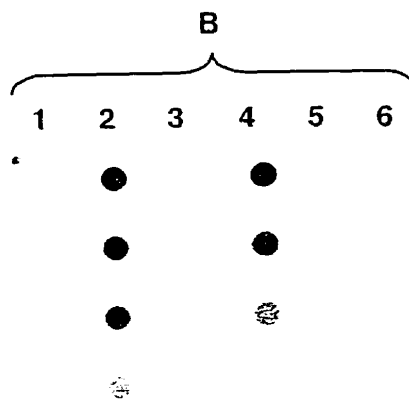
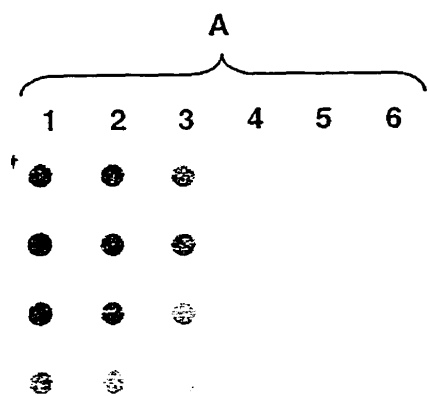


-









## **CHAPITRE 3**

### **Développement d'un test ELISA compétitif pour le dosage de la vitamine D.**

Julie Jean, C. Turcotte, R.E. Simard et I. Fliss

## RÉSUMÉ

La vitamine D joue un rôle important dans la croissance et le fonctionnement normal de tous les êtres humains. Au Canada, en raison de l'exposition limitée au soleil, le lait et les produits laitiers fortifiés deviennent la source essentielle de vitamine D dans le régime alimentaire. La consommation de doses recommandées de vitamine D ne cause pas de problème. Cependant, une déficience ou un excès de vitamine D sont souvent associés à des disfonctions sérieuses à la santé. Tel que rapporté dans plusieurs enquêtes épidémiologiques réalisées au Canada et aux États-Unis, le lait fortifié contient rarement la quantité de vitamine D indiquée sur l'étiquette et peut être soit « sur-fortifié » ou « sous-fortifié ». Les deux cas sont néfastes à l'humain. Un contrôle plus rigoureux du procédé de fortification est donc nécessaire pour éviter ces accidents.

Les méthodes chromatographiques traditionnellement utilisées pour la quantification de la vitamine D sont coûteuses et limitées en terme de rapidité, de sensibilité et de spécificité. Habituellement, ces méthodes exigent une saponification longue et difficile et des étapes d'extraction au cours desquelles une fraction importante de vitamine D est perdue. Le développement d'une méthode alternative plus précise, peu coûteuse, hautement spécifique et facile d'usage s'avère nécessaire.

L'objectif général de cette étude est de développer un test ELISA compétitif pour la détection et la quantification spécifique et précise de la vitamine D dans le lait fortifié.

Dans des conditions optimales (2 µg/ml d'anticorps et 5 µg de cOVA-vitamine D immobilisée par puit), un seuil de détection de 300 ng/ml est obtenu en 4 heures seulement. Une très bonne corrélation ( $R^2=0,981$ ) est obtenue entre la quantité de cOVA-vitamine D contenu dans l'échantillon et le signal obtenu par ELISA compétitif. Aucune inhibition n'a été obtenue en présence de cOVA ou de nOVA confirmant la spécificité de l'anticorps produit et par conséquent du test ELISA développé.

L'approche immunologique proposée semble donc être très réaliste et le test développé peut être proposé après validation par l'analyse d'échantillons alimentaires fortifiés, comme méthode alternative aux méthodes chromatographiques traditionnelles pour le dosage de la vitamine D.

### 3.1 INTRODUCTION

La vitamine D est une vitamine liposoluble qui joue un rôle très important dans le maintien de l'homéostasie du calcium et du phosphore (Machlin, 1991). Le nom vitamine D a été souvent associé à des composés ayant des activités anti-rachitiques importantes. Pour bénéficier de ces effets, un apport journalier de l'ordre de 200 à 400 UI est recommandé (Yendt, 1994). Malheureusement, ces doses sont souvent difficiles à atteindre surtout au Canada et aux États-Unis à cause de la faible exposition au soleil, élément essentiel pour la synthèse cutanée de la vitamine D. Dans ces pays et pour contrer ce problème, certains aliments notamment le lait sont enrichis de vitamine D. Actuellement, près de 85% de lait commercial et presque tous les laits évaporés sont fortifiés en vitamine D.

La consommation de produits alimentaires fortifiés est certes une façon efficace pour contrer ces carences en vitamine D. Cependant, une consommation inadéquate de ces produits peut s'accompagner d'effets indésirables dont les répercussions sur la santé de l'être humain sont souvent néfastes. En effet, des récentes constatations sur l'intoxication ou la carence en vitamine D ont suscité des questions concernant la quantité réelle de vitamine D ajoutée dans le lait et les produits laitiers fortifiés. Une récente enquête, conduite au Canada et aux États-Unis, a clairement montré que le lait et les formules pour nourrissons contiennent rarement la quantité de vitamine D indiquée sur l'étiquette (Cottrel, 1988 et Holick et al., 1992). Chen et al.(1993) rapportaient récemment que 80% des échantillons de lait pris aux États-Unis contenaient 20% de moins ou 20% de plus de vitamine D que la quantité indiquée sur l'étiquette. Les résultats dans les échantillons de lait pris au Canada montraient que 73% des échantillons contenaient moins que 80% ou plus que 120% de la quantité de vitamine D requise. Quatorze pourcent des échantillons ne contenaient pas de vitamine D détectable alors qu'un échantillon de lait entier contenait 363% de la quantité indiquée sur l'étiquette.

Cette situation est attribuable essentiellement à l'absence d'outils efficaces pour le dosage de la vitamine D dans ces produits enrichis. Les méthodes actuelles utilisées que ce soit les méthodes chromatographiques (Sliva et al., 1992; Hagar et al., 1994; Hasegawa, 1992;

Agrawal, 1987) ou biologiques (Machlin, 1991) sont souvent longues et coûteuses. De plus, toutes ces méthodes requièrent des étapes préalables d'extraction et de saponification qui s'accompagnent de la perte d'une fraction importante de vitamine D. La recherche et le développement de méthodes alternatives plus adéquates permettraient de palier à ces problèmes. Récemment, Jean et coll. (1998) ont réussi à produire des anticorps polyclonaux capables de reconnaître spécifiquement la vitamine D. Lors de ce travail, ces anticorps seront utilisés afin de développer une méthode ELISA de type compétitive pour la détection et la quantification spécifique et précise de la vitamine D dans le lait fortifié.

## **3.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **3.2.1 Préparation du complexe cOVA-vitamine D**

La vitamine D est un petit haptène, de nature hydrophobe, ayant un poids moléculaire de 384 daltons. Pour augmenter sa solubilité et son pouvoir de fixation sur un support solide, la vitamine D<sub>3</sub> (cholecalciférol, Sigma, St-Louis, MO) a été complexée à une molécule transporteuse de haut poids moléculaire, l'OVA (ovalbumine). Le complexe cOVA-vitamine D a été préparé selon la stratégie décrite Jean et coll. (1998). En bref, cette stratégie comprenait deux étapes. La première étape consiste à cationiser l'OVA (Imject Ovalbumin, Pierce, Rockford, IL). Cette cationisation permet la substitution des groupes carboxyles de la protéine par des groupements amines. La protéine cationisée ainsi obtenue (cOVA) possède un point isoélectrique basique et permet la fixation d'une plus grande quantité de molécules de vitamine D. Cette réaction de cationisation est catalysée par le EDC (1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride, Aldrich, Milwaukee, WI). Le couplage proprement dit entre la protéine cationisée et la vitamine D est basé sur une réaction d'aminalkylation dite de Mannich entre un hydrogène actif de la vitamine D et le groupement amine actif de la molécule de cOVA. L'efficacité de la cationisation est vérifiée par analyse du produit obtenu sur un gel de polyacrylamide. L'efficacité du couplage entre la cOVA et la vitamine D est vérifiée par analyse du produit de la réaction par spectroscopie infrarouge.

### 3.2.2 Anticorps anti-vitamine D

L'anticorps anti-vitamine D a été produit chez des lapines de type Nouvelle-Zélande tel que décrit précédemment par Jean et coll. (1998). Le sérum brut est par la suite purifié à l'aide d'une stratégie de purification sur colonne de chromatographie d'affinité à trois étapes: Protéine A/G-Agarose, cBSA-Sépharose, cOVA-vitamine D-Sépharose.

### 3.2.3 Procédure de l'ELISA compétitif

Le principe de l'ELISA compétitif développé est présenté à la figure 3.1.

L'essai développé comprend deux étapes successives. Lors de la première étape, effectuée en tube, des dilutions en série du complexe cOVA-vitamine D à des concentrations allant de 20 µg/ml à 300 ng/ml sont préparées dans un tampon phosphate (PBS). Cent microlitres de chaque dilution sont transférés dans des tubes contenant 100 µl d'anticorps anti-vitamine D à une concentration de 2 µg/ml dans un tampon PBS contenant 0,5% d'une solution de blocage (Blocking reagent, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Le mélange est alors incubé pendant 2 h à 37°C avec agitation puis utilisé pour la deuxième étape. Lors de cette étape, 100 µl de chacune des réactions sont transférés dans des puits d'une microplaque à ELISA (Immulon II, Dynatech Laboratories, Alexandria, VA) préalablement couverts pendant une nuit à 4°C de 200 µl d'une solution de cOVA-vitamine D diluée dans un tampon carbonate-bicarbonate pH 9,6 à une concentration de 10 µg/ml, bloqués pendant 1 h à la température de la pièce à l'aide d'une solution de blocage à 1% puis lavés trois fois avec une solution de TBS contenant 0,1% Tween 20 (TBS-T). Les plaques sont alors incubées pendant 2 h à 37°C avec 100 µl du mélange préalablement incubé et lavées quatre fois avec du TBS-T afin d'éliminer le résiduel d'échantillon non fixé. La dernière étape de l'essai correspond à l'ajout de 100 µl d'une solution d'anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase et dilué 1:1000 dans du PBS contenant 0,5% de solution de blocage (PBS-0,5BR). Ces anticorps anti-lapin réagiront avec les anticorps anti-vitamine D libres qui ont pu réagir avec le complexe cOVA-vitamine D fixé sur la microplaque. La révélation de cette réaction se fait grâce à l'ajout d'un substrat soluble

de la peroxydase, l'orthophénylène diamine et d'une lecture de l'absorbance à 450 nm. L'intensité du signal obtenu est inversement proportionnelle à la quantité de cOVA-vitamine D présente dans l'échantillon de départ.

### 3.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

La vitamine D est un haptène de faible taille et les tests immunologiques de type compétitif sont donc les seuls formats possibles pour la détection de ce composé dans un échantillon alimentaire donné. Le principe du test ELISA compétitif indirect développé est illustré à la figure 3.1. L'utilisation d'un anti-lapin marqué est rendue indispensable en raison de la difficulté à marquer la vitamine D à l'aide d'un marqueur non radioactif. Les concentrations des différents paramètres du test ont été choisies de façon à obtenir le meilleur signal spécifique. La concentration de cOVA-vitamine D fixée au fond des puits est de 2 µg par puits. L'utilisation d'une concentration élevée en cOVA-vitamine D permet d'avoir suffisamment de cible pour les anticorps anti-vitamine D qui demeurent libres dans le mélange de départ. La concentration en anticorps anti-vitamine D ajoutée à l'échantillon analysé a été optimisée de façon à avoir le plus faible ratio signal obtenu en présence d'antigène/ signal en absence d'antigène. La figure 3.2 représente les courbes des signaux obtenus avec différentes concentrations d'anticorps anti-vitamine D en présence et en absence d'antigène. L'examen de ces courbes et du tableau 3.1 montrent qu'à des concentrations inférieures à 0,125 µg/ml, le ratio est élevé ce qui veut dire que la différence entre les deux signaux est faible. Ceci peut être expliqué par la faible concentration d'anti-vitamine D qui devient un facteur limitant pour cet essai. À des concentrations supérieures, une différence significative est obtenue entre le signal obtenu dans la réaction effectuée en présence d'antigène et en absence d'antigène. Cette expérience a été réalisée en duplicata et de très faibles écarts-types ont été obtenus (non visibles sur le graphique). Dans notre cas, la concentration de 2 µg/ml d'anticorps anti-vitamine D a été retenue pour le reste du travail. Aucune inhibition n'est obtenue lorsque l'OVA cationisée et l'OVA native sont utilisées et ceci même à des concentrations de 10 µg/ml (résultats non présentés). Cette expérience prouve une fois de plus la spécificité de l'anticorps produit.



La spécificité du signal obtenu a été vérifiée par l'analyse de solutions de cOVA-vitamine D ayant des concentrations allant de 10 µg/ml à 150 ng/ml. À des concentrations comprise entre 10 µg/ml et 300 ng/ml, le signal obtenu est strictement proportionnel à la concentration de cOVA-vitamine D contenue dans l'échantillon avec un coefficient de corrélation de 0.981 (Fig. 3.3). À des concentrations inférieures, le signal obtenu demeure constant. En vertu de ce résultat, on peut dire que le seuil de détection obtenu par la méthode ELISA développée est de 300 ng/ml. A noter que cette expérience a été également réalisée en duplicata et que les écarts-types obtenus sont tellement faibles qu'on les observe pas sur le graphique.

Des expériences d'inhibition en présence de vitamine D seule sont en cours. Au préalable, le problème de solubilité de la vitamine D dans des tampons usuels tels que PBS et TBS doit être résolu. La validité du test développé sera vérifiée par analyse d'échantillons de lait fortifié et comparaison des résultats à ceux obtenus avec la méthode chromatographique de référence.

En conclusion, le test ELISA compétitif offre un excellent outil de quantification de la vitamine D. Un tel format est beaucoup moins coûteux que les méthodes chromatographiques et biologiques traditionnelles et permet l'analyse de plusieurs échantillons simultanément. La sensibilité obtenue correspond aux concentrations de vitamine D normalement ajoutées dans le lait.

### 3.4 RÉFÉRENCES

**Agarwal, V.K.** (1987) Liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milk. *J. AOAC.*, 71: 19-24.

**Chen, T.C., Heath, H. et Hollick, M.F.** (1993) An update on the vitamin D content of fortified milk from United States and Canada. *N. Engl. J. Med.*, 329: 1507.

**Cottrel, R.C.** (1988) Milk and milk products unbalanced diet, *J. Society Dairy Tech.*, 41: 95-109.

**Hagar, A.F., Madsen, L., Wales, L. Jr et Bradford, H.B. Jr** (1993) Reversed-phase liquid chromatographic determination vitamin D in milk. *J. AOAC Inter.*, 77: 1047-1051.

**Hasegawa, H.** (1992) Vitamin D determination using high-performance liquid chromatography with internal standard-redox mode electrochemical detection and its application to medical nutritional products. *J. Chromato.*, 6095: 215-220.

**Hollick, M.F, Shao, Q., Lui, W.W et Chen, T.C.** (1992) The vitamin D content of fortified milk and infant formula. *N. Engl. J. Med.*, 326: 1178.

**Jean, J., Turcotte, C., Simard, R.E. et Fliss, I.** (1998) Efficient molecular strategy for the production and characterization of polyclonal antibodies against cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>). *J. Immunol. Methods*, (soumis).

**Machlin, L.** (Ed). (1991) *Handbook of vitamins*, 2<sup>nd</sup> Edition, Marcel Dekker, New York, USA, p. 59.

**Sliva, M.G., Green, A.E., Sanders J.K., Euber, J.R. et Saucerman, J.R. (1992) Reversed-phase liquid chromatographic determination of vitamin D in infant formulas and enteral nutritionals. J. AOAC Int. 75: 566-571.**

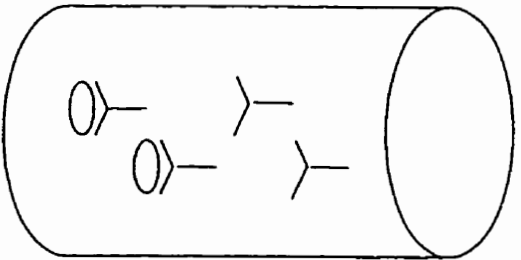
### 3.5 Figures et tableaux

**Figure 3.1** - Représentation schématique du principe du test de type ELISA compétitif.

**Figure 3.2** - Variation du signal obtenu par ELISA compétitif en fonction de la concentration en anticorps anti-vitamine D en présence et en absence de cOVA-vitamine D.

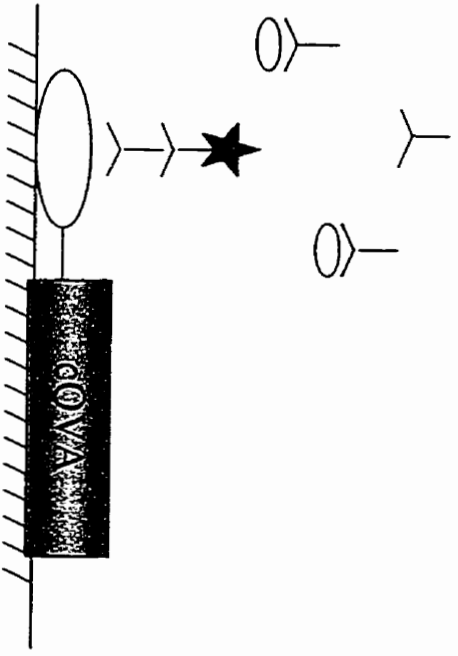
**Figure 3.3** - Étude de la corrélation entre la concentration en cOVA-vitamine D et le signal obtenu par ELISA compétitif.

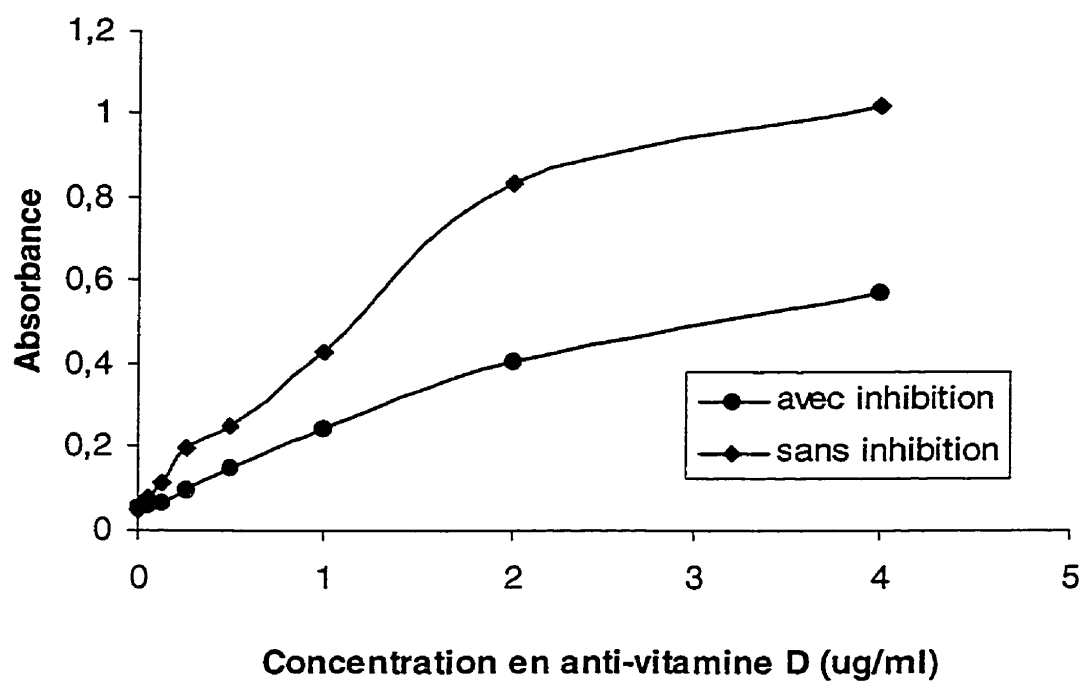
**Tableau 3.1** Évaluation du ratio signal de l'ELISA compétitif en présence de cOVA-vitamine D sur celui en absence de cOVA-vitamine D.

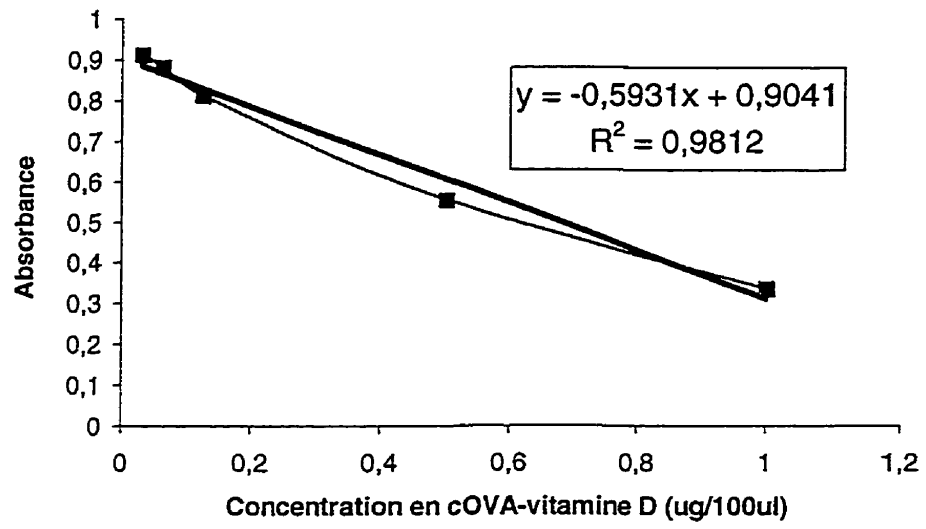


Lait fortifié

Signal  $\propto$   $\frac{1}{[vitamine D]}$











## CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans cette étude, une stratégie moléculaire de conjugaison entre la vitamine D et une molécule transporteuse a été développée. Le complexe cBSA-vitamine D a été utilisé pour l'immunisation de lapines de type Nouvelle-Zélande. Les anticorps polyclonaux produits ont été purifiés par une stratégie de purification à trois étapes : Protéine A/G-Agarose, cBSA-Sépharose et cOVA-vitamine D-Sépharose. Bien qu'il nous a été impossible d'effectuer des essais avec de la vitamine D seule compte tenu de son fort caractère hydrophobe et de son insolubilité dans la majorité des tampons utilisés, l'ensemble des expériences de spécificité réalisées avec les anticorps purifiés nous semblent suffisant pour conclure que les anticorps produits sont spécifiques à la vitamine D.

Deux formats de test immunologiques ont été développés, un test Immunoblot et un test de type ELISA compétitif. Une sensibilité de l'ordre de quelque nanogramme et une forte corrélation entre la concentration en antigène testée et le signal généré ont été obtenues. Des analyses sur des aliments fortifiés devraient être réalisées prochainement pour la validation du test développé.

Les stratégies immunologiques ainsi développées paraissent très prometteuses en terme de sensibilité, de rapidité et de simplicité. Elles offrent un excellent potentiel pour l'automatisation et l'utilisation en analyse de routine pour la quantification de la vitamine D dans le lait et les autres produits laitiers fortifiés.