

Une méthode pour supprimer les faux signaux positifs dus au conjugué dans le cas de l'analyse par immunoblotting des allergènes du blé

Isabelle Bouchez-Mahiout¹, Élodie Boulenc, Jacques Snégaroff¹, Michel Laurière¹

La vérification de la spécificité de la réaction observée est un problème général en immunoanalyse. Nous avons été confrontés à de faux signaux positifs lors de la détection des IgE anti-protéines de blé à l'aide d'un conjugué anti-IgE humaine associé à la peroxydase de Raiford par chimiluminescence. L'utilisation classique de lait délipidé comme solution de saturation diminue ces réactions indésirables, mais également fortement le signal spécifique. Une méthode simple de double saturation, à base de polyvinylpyrrolidone-40 et de lait délipidé nous a permis d'obtenir un signal spécifique fort tout en éliminant les réactions qui ne l'étaient pas.

Résumé : *Les préparations d'anticorps secondaires utilisées pour les analyses par immunoblotting des protéines alimentaires produisent souvent des signaux faussement positifs lorsqu'elles sont associées à des méthodes de détection très sensibles, comme la chimiluminescence. Lors de l'étude des protéines de blé, on a observé que de telles réactions indésirables étaient dues à la présence d'anticorps mineurs dirigés contre les protéines provenant de l'alimentation de l'animal utilisé pour produire ces préparations. Le lait délipidé, un bloquant classique, supprime ces réactions, mais diminue également fortement le signal spécifique lorsqu'il est utilisé tout au long du protocole. Une procédure simple de double-saturation de la membrane a été développée, à savoir l'utilisation d'une solution à base de polyvinylpyrrolidone-40 pour toutes les étapes, sauf pour l'incubation avec le conjugué où une saturation à base de lait délipidé est utilisée. Dans ces conditions, les réactions non spécifiques sont éliminées tout en maintenant le signal spécifique. La procédure est appliquée à la détection des IgE réactifs avec les allergènes de blé.*

Mots clé : réactifs de saturation, chimiluminescence, détection des IgE, protéines de blé, réactions non spécifiques, immunotransfert

Introduction

L'évaluation de la spécificité de la réaction observée est un problème général de l'immunochimie, elle est obtenue par l'utilisation de contrôles faits dans les mêmes conditions et parallèlement à l'expérience. Les signaux détectés alors peuvent être dus, soit à des réactions spécifiques parasites, soit à des réactions non spécifiques liées à des adsorptions des protéines entre-elles ou sur le support ; cela donne des bandes additionnelles en immunotransfert ou bien un bruit de fond important. On minimise ces réactions en jouant sur la dilution des réactifs, le choix des solutions de saturation comme le sérum albumine bovine

¹ UMR 206 de Chimie-Biologique INRA AgroParisTech, F-78850, Thiverval-Grignon, France

☎ 01 30 81 54 66 ✉ bouchez@grignon.inra.fr

(BSA), la gélatine, le lait délipidé, le polyvinylpyrrolidone-40 (PVP-40) (Bartles JR *et al.*, 1984 – Battais F. *et al.*, 2003) additionné ou non de détergents non ioniques tels le Triton X100 ou le Tween20. On doit toutefois être vigilant dans l'utilisation de ce dernier car de fausses réactions positives ont été mises en évidence en l'absence de protéines additionnelles (Bird CR *et al.*, 1988). Les préparations d'anticorps secondaires sont également une source fréquente de faux signaux positifs. Lasne F. (2003) a suggéré un protocole de double transfert pour les supprimer. Lorsque ces solutions expérimentales ne marchent pas, Marumaya *et al.*, (1998) ont proposé, comme pour l'ELISA, de soustraire le signal du contrôle, qui correspond à des réactions spécifiques parasites provenant de la préparation d'anti-IgE humaine, au signal total obtenu avec le sérum du patient, après une analyse densitométrique du blot.

Nous présentons ici des réactions parasites similaires obtenues lors de l'analyse des allergènes de blé par immunoblot ; elles seraient dues à des anticorps anti-protéines alimentaires présents dans la préparation d'anticorps secondaires. Et, nous décrivons un protocole d'élimination de ces réactions parasites respectant le signal spécifique, s'appuyant sur l'utilisation d'une double saturation : par le PVP-40 et par le lait de vache délipidé.

1. Matériels et méthodes

1.1 Matériel

Tous les réactifs sont de qualité analytique. Le conjugué de lapin anti-IgE-humaine couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) provient de la société Dako S. A. (Trappes, Fr). Celui de chèvre anti-IgE-humaine couplé à la phosphatase alcaline et le PVP40 proviennent de Sigma (St Louis, MO, USA). Le « SuperSignal West Dura Extended Duration[®] » vient de Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA), le kit « Aurora[™] western blot chemiluminescent detection kit » de MP Biomedicals (Irvine, CA, USA) et le kit « Opti 4 CN substrate Kit » ainsi que le module « Western Blot amplification module » des laboratoires Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Le lait délipidé vient de Régilait (St Martin Belle Roche, Fr). Les membranes d'Immobilon-P[™], en Polyvinylidène difluoride (PVDF), viennent de Millipore Corp. (Bedford, MA, USA), les gels pré-coulés NuPAGE de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) et les films X-OMAT AR-5 films de GE Healthcare (Buckinghamshire, GB).

1.2 Sérums

Pour les expériences nous avons utilisé un sérum avec un titre élevé d'IgE spécifiques anti-protéines de blé (Pharmacia CAP, classe 6), il a été fourni par PlasmaLab International (Everett, WA, USA).

1.3 Extraits protéiques de blé

Les protéines provenant de 40 mg de farine issue de 4 variétés de blé hexaploïdes (cv. Craklin, Soissons, Recital et Tamaro) sont extraites par 1 mL de tampon de Laemmli (63 mM tris-HCl pH 6,8, 10 % (p/v) glycérol, 2 % (p/v) Sodium Dodecyl sulfate (SDS), 5 % (v/v) 2-mercaptoéthanol) par agitation douce pendant 1 H puis bouillies 5 min. Après centrifugation (5 min à 11000 g), le surnageant est récupéré.

1.4 Electrophorèse en gel de polyacrylamide, en présence de SDS (SDS-PAGE) et transfert

La SDS-PAGE est conduite en utilisant un gel Nu-PAGE pré-coulé de gradient d'acrylamide 4-12 %, en tampon MOPS, selon les recommandations du fabricant. 20 µg de protéines sont déposés par puits.

L'électrotransfert semi-sec sur membrane de PVDF est conduit selon le protocole de Laurière (1993).

1.5 Détection des IgE par chimiluminescence

A moins que ce ne soit précisé dans le texte, le protocole suivant a été utilisé : les membranes de PVDF ont tout d'abord été saturées pendant 2 h en 50 mM tampon phosphate, pH 7,4, 150 mM NaCl (tampon PBS), 0,1 % (p/v) Tween 20 (tampon PBST), 2 % (p/v) PVP-40. Elles sont ensuite incubées 1 nuit à 4 °C avec le sérum de patient dilué au 1/10 en PBST, 2 % (p/v) PVP-40. Après trois lavages, le conjugué de lapin anti-IgE-humaine couplé à la HRP est ajouté, au 1/25000 en PBST, 3 % (p/v) lait délipidé pendant 2 h. Après 7 lavages, les membranes sont incubées 5 min dans le substrat de chimiluminescence. Tous les lavages durent 10 min et sont en PBST, 2 % (p/v) PVP-40, sauf les deux derniers en PBS. Toutes les étapes se font sous agitation douce, excepté la coloration, et à température ambiante, excepté l'incubation avec le sérum, à 4 °C.

Dans les expériences préliminaires, trois protocoles, combinant 2 types de saturants, deux conjugués anti-IgE et trois systèmes de détection sont comparés. La chimiluminescence est captée sur film X-OMAT AR-5 comme pour une autoradiographie selon Eynard *et al.*, (1998).

2. Résultats

2.1 Mise en évidence de la réaction directe des anticorps secondaires avec les protéines de blé (figure 1)

Dans des expériences préliminaires d'identification des allergènes de blé, nous avons utilisé trois protocoles différents, adaptés au faible niveau des IgE dans le sérum humain. Ils sont basés sur une SDS-PAGE, transfert sur membrane de PVDF et action du sérum humain (lignes 1) ou non, comme contrôle (lignes 2). Les protocoles diffèrent principalement par le type de saturation et par la révélation finale, à savoir, soit une réaction de colorimétrie (le kit « Opti 4 CN substrate », panneau A), soit une réaction de chimiluminescence (le kit Aurora (panneau B) ou le « SuperSignal West Dura Extended Duration[®] » (panneau C). De façon surprenante, le signal ne diffère pas entre l'essai (lignes 1) et le contrôle (lignes 2). Cela met en évidence la présence d'anticorps spécifiques du blé dans le conjugué, ce qui fausse le résultat.

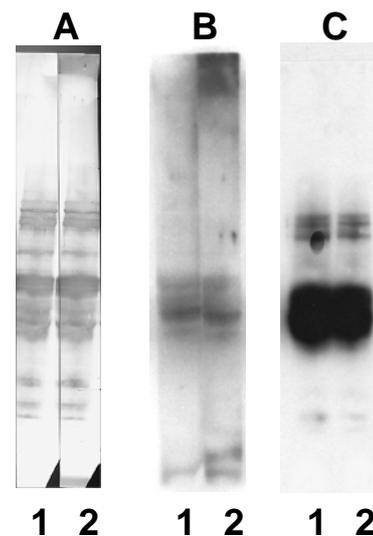


Figure 1 : réactions parasites dues aux anticorps secondaires

2.2 Essai d'élimination des fausses réactions positives dues au conjugué (Figure 2)

Différentes conditions d'immunodétection ont été testées pour supprimer ces faux signaux positifs (figure 2). La comparaison entre l'essai avec sérum (lignes 1) et le contrôle sans sérum (lignes 2) est effectuée. La solution de saturation contenant du PVP40 utilisée par Battais *et al.*, (2003), lorsqu'elle est utilisée seule à 2 % (p/v) en PBST pour toutes les incubations et étapes de lavage, n'a pas d'effet sur les faux signaux positifs (panneau A, ligne 2).

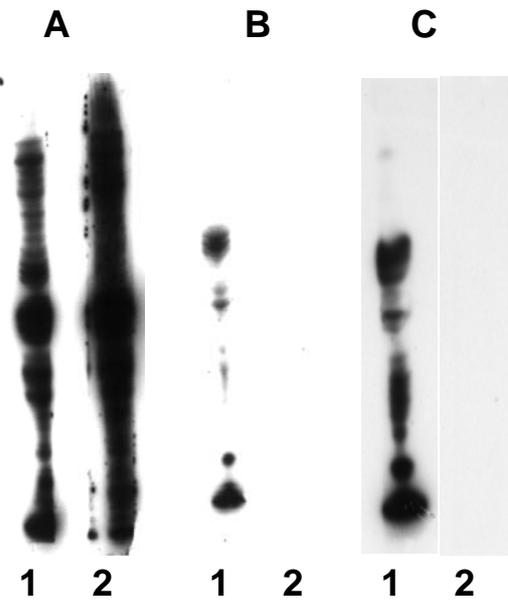


Figure 2 : *Elimination des faux signaux positifs par double saturation*

Au contraire, les faux signaux positifs disparaissent complètement lorsque le PVP40 est remplacé par 5 % (p/v) de lait délipidé (panneau B, ligne 2), mais, en contrepartie, le signal chimiluminescent devient faible (panneau B, ligne 1). Les réactions parasites provenant vraisemblablement du conjugué de lapin anti-IgE-humaine couplé à la HRP, une combinaison des deux bloquants a été testée : 5 % (p/v) de lait en PBST a été utilisé pour l'étape d'incubation avec le conjugué, tandis que 2 % (p/v) PVP40 en PBST a été utilisé dans toutes les autres étapes (panneau C). Cela permet d'obtenir une réponse spécifique plus forte (comparer lignes 1, panneau B et C) tout en maintenant une absence de réactions parasites (panneau C, ligne 2).

2.3 Optimisation de la concentration en lait

Comme le lait a un effet à la fois sur la réponse spécifique et sur les réactions parasites, sa concentration a été ajustée (**figure 3**).

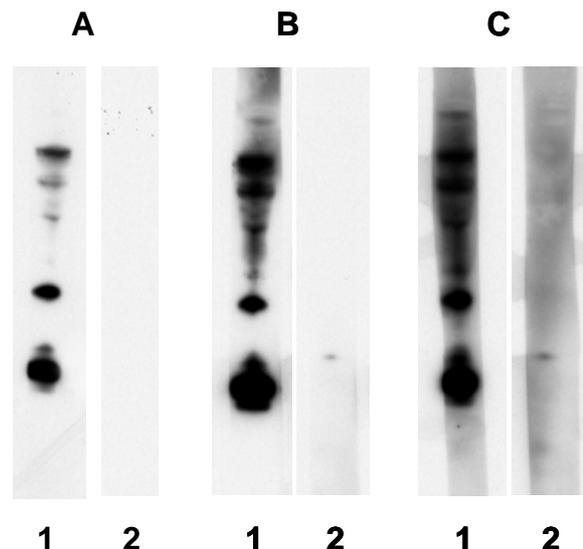


Figure 3 : *Optimisation de la concentration en lait lors de l'incubation avec le conjugué de lapin anti-IgE-humaine couplé à la HRP*

Trois concentrations de lait en PBST ont été utilisées, 5 % (p/v) (panneau A), 3 % (p/v) (panneau B) et 1 % (p/v) (panneau C) et la comparaison entre l'essai (lignes 1) et le contrôle sans sérum (lignes 2) effectuée. On constate que le bruit de fond s'accroît lorsqu'on diminue trop fortement la concentration en lait (panneau C). La concentration optimale, permettant une absence de réaction parasite et de bruit de fond tout en maintenant une réaction spécifique forte est 3 % (p/v).

Conclusion

Les réactions décrites dans cet article ont uniquement lieu lorsqu'une préparation d'anticorps secondaire est utilisée et suggèrent que ce ne sont pas des liaisons non spécifiques de protéines sur d'autres protéines ou bien des protéines sur la membrane mais des réactions parasites dues à des anticorps du conjugué spécifiques des protéines étudiées, comme l'ont déjà montré Lasne (2003) et Maruyama *et al.*, (1998). Les protéines étudiées proviennent du blé et elles sont présentes dans l'alimentation des animaux comme la vache ou le lapin. Ce dernier est l'animal producteur des anticorps secondaires utilisés pour notre étude. Il est connu que des anticorps dirigés contre l'alimentation de l'animal sont présents dans le sérum ou le lait (Rumbo M. *et al.*, 1998). On peut supposer que de petites quantités de ces anticorps sont présentes en même temps que les anticorps anti-IgE humaine et sont conjugués avec l'enzyme durant la préparation du réactif. La présence de tels anticorps anti-protéines de blé expliqueraient les réactions spécifiques parasites observées lorsque les membranes sont incubées uniquement avec le conjugué de lapin anti-IgE-humaine couplé à la HRP. L'utilisation de lait délipidé comme bloquant abolit ces réactions mais diminue également la réactivité des IgE avec les protéines allergéniques du blé. En tenant compte de ces observations, nous proposons un protocole simple et facile à mettre en œuvre pour limiter ces réactivités parasites. Il implique l'utilisation de lait à 3 % (p/v) en PBST pour adsorber les anticorps interférents présents dans le réactif secondaire, et du PVP40 à 2 % (p/v) en PBST dans toutes les autres étapes, de façon à limiter les interférences du lait dans la liaison des IgE sur les protéines du blé.

Bibliographie

- Bartles J.R., Hubbard A. L. (1984) 125 I-wheat germ agglutinin blotting: Increased sensitivity with polyvinylpyrrolidone quenching and periodate oxidation/reductive phenylation. *Anal Biochem.* 140 - 284-292.
- Battais F., Pineau F., Popineau Y., Aparicio C., Kanny G., Guerin L., Moneret Vautrin D.A., and Denery-Papini S. (2003) Food allergy to wheat: identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clin Exp Allergy.* 33- 962-70.
- Bird C.R., Gearing A.J., and Thorpe R. (1988) The use of Tween 20 alone as a blocking agent for immunoblotting can cause artefactual results. *J Immunol Methods.* 106 -175-9.
- Eynard L., Lauriere M. (1998) The combination of Indian ink staining with immunochemiluminescence detection allows precise identification of antigens on blots: application to the study of glycosylated barley storage proteins. *Electrophoresis.* 19 -1394-6.
- Laurière M. (1993) A semidry electroblotting system efficiently transfers both high- and low-molecular-weight proteins separated by SDS-PAGE. *Anal. Biochem.* 212 - 206-211.

- Lasne F. (2003) Double-blotting: a solution to the problem of nonspecific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Methods*. 276 223-6.
- Maruyama N., Ichise K., Katsube T., Kishimoto T., Kawase S., Matsumura Y., Takeuchi Y., Sawada T., and Utsumi S. (1998) Identification of major wheat allergens by means of the *Escherichia coli* expression system. *Eur J Biochem*. 255 - 739-45.
- Rumbo M., Chirido F.G., Anon M.C., Fossati C.A. (1998) Detection and characterization of antibodies specific to food antigens (gliadin, ovalbumin and beta-lactoglobulin) in human serum, saliva, colostrum and milk. *Clin Exp Immunol*. 112 - 453-8.