

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR
FRANCIS GAGNON

CONSTRUCTION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL BISPÉCIFIQUE POUVANT
RECONNAITRE TOUTES LES ENTÉROTOXINES SÉCRÉTÉES PAR S. aureus.

DÉCEMBRE 1992

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	iii
LISTE DES TABLEAUX	iv
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
SOMMAIRE	x
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. INTRODUCTION: <u>Staphylococcus aureus</u>	3
1.1 Classification et identification	3
1.2 Substances d'intérêt biologiques sécrétées par <u>S. aureus</u>	4
2. LES ENTÉROTOXINES DE <u>S. AUREUS</u>	5
2.1 Généralités sur les entérotoxines	5
2.2 Propriétés physico-chimiques des entérotoxines .	7
2.3 Propriétés biologiques des entérotoxines	9
2.4 Propriétés immunologiques des entérotoxines . .	13
3. DÉTECTION DES ENTÉROTOXINES	15
3.1 Tests biologiques	15
3.2 Tests immunologiques	16
4. ANTICORPS MONOCLONAUX	20
4.1 Introduction	20
4.2 Utilisation des anticorps monoclonaux pour la détection des entérotoxines	21
5. LES ANTICORPS BISPÉCIFIQUES	24
5.1 Méthodes biologiques.	25
5.2 Méthodes chimiques	26
OBJECTIF DE LA RECHERCHE	32

MATÉRIEL ET MÉTHODE	33
1. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX	33
1.1 Immunisation des souris	33
1.2 Production des hybridomes	33
1.3 Sélection des hybridomes	36
1.3.1 La technique ELISA directe	36
1.3.2 La technique ELISA indirecte.	39
1.3.3 Entreposage des clones sélectionnés	40
1.4 Production de liquide d'ascite	40
1.5 Purification des anticorps monoclonaux	41
1.6 Concentration et lyophilisation des Ac purifiés	42
1.7 Caractérisation des Ac monoclonaux	42
1.7.1 Détermination des classes et sous-classes ainsi que les chaînes légères des immunoglobu lines	42
1.7.2 Technique d'ELISA compétitif	43
1.7.3 Isoélectrofocalisation	43
1.8 Élimination de la réaction croisée entre la SPA et les anticorps	43
1.8.1 Préparation des fragments F(ab') ₂	43
2. CONSTRUCTION D'ANTICORPS BISPÉCIFIQUES	45
RÉSULTATS	49
1. IMMUNISATION DES SOURIS	49
1.1 Fusions cellulaires	49
2. SÉLECTION DES HYBRIDOMES	50
2.1 Test ELISA direct	50
2.2 Caractérisation des Ac monoclonaux	51
2.3 Obtention des liquides d'ascite	54
2.4 Analyse de la réaction des anticorps monoclonaux purifiés avec les entérotoxines	55
3. LES ANTICORPS BISPÉCIFIQUES	72
3.1 Calibration de la colonne de Superose-6	72
3.2 Couplage de deux anticorps de lapin anti-SE	72
3.3 Couplage des anticorps monoclonaux D8A8F7-A et 2E11H1C7	75
4. DÉTECTION DES ENTÉROTOXINES AVEC LES ANTICORPS BISPÉCIFIQUES	75
DISCUSSION	82

CONCLUSION	94
REMERCIEMENTS	96
BIBLIOGRAPHIE	97

LISTE DES TABLEAUX

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

TABLEAU I	Incidence des empoisonnements alimentaires dus à <u>S.aureus</u>	6
TABLEAU II	Homologie des séquences d'acides aminés entre les différentes entérotoxines	9
TABLEAU III	Principales propriétés physico-chimiques des entérotoxines staphylococciques	11

MATÉRIEL ET MÉTHODES

TABLEAU IV	Schéma d'immunisation des souris	33
TABLEAU V	Préparation des échantillons d'entérotoxines en compétition pour un même AMC	43
TABLEAU VI	Sélection des AMC sécrétés par les hybridomes de la fusion FA-5	51
TABLEAU VII	Sélection des AMC sécrétés par les hybridomes de la fusion FB-2	52
TABLEAU VIII	Caractérisation des AMC sélectionnés	67

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Schéma représentant la génération d'hybridomes ainsi que la production d'AMC	22
Figure 2	Composition du mélange d'Ac sécrétés par les triomes et quadromes	27
Figure 3	Schéma du couplage de deux Ac à l'aide du SPDP	30
Figure 4	Profil d'élution de l'AMC D8A8F7-A sur une colonne d'agarose-SPA	56
Figure 5	Profil d'élution de l'AMC 2E11H1C7 sur une colonne d'agarose-SPA	57
Figure 6	Titration de l'AMC 2E11H1C7 par le test ELISA direct	59
Figure 7	Titration de l'AMC D8A8F7-A par le test ELISA direct	60
Figure 8	Titration de l'AMC 2E11H1C7 par le test ELISA indirect	61
Figure 9	Titration de l'AMC D8A8F7-A par le test ELISA indirect	62
Figure 10	Inhibition de la réaction de l'AMC 2E11H1C7 avec SEB par des concentrations croissantes des diverses SEs	64
Figure 11	Inhibition de la réaction de l'AMC D8A8F7-A avec SEA par des concentrations croissantes des diverses SEs	65
Figure 12	Détection des SEB et SEC ₁ par l'AMC 2E11H1C7 par un test ELISA indirect	66
Figure 13	Détection de la SEA par l'AMC D8A8F7-A par un test ELISA indirect	67
Figure 14	Analyse sur une colonne de Superose-6 des fragments F(ab') ₂ obtenus par la digestion de l'AMC D8A8F7-A avec la pepsine	70

Figure 15	Analyse des IgG non dégradés lors de la digestion de l'AMC D8A8F7-A par la pepsine, sur une colonne de Superose-6	71
Figure 16	Analyse sur une colonne de Superose-6 des fragments F(ab') ₂ de l'AMC D8A8F7-A après ultrafiltration sur Centricon-30	73
Figure 17	Calibration de la colonne de Superose-6 à un débit de 0,5 mL/min.	74
Figure 18	Analyse des Ac polyclonaux bispécifiques sur deux colonnes Protein Pak 300 SW montées en séries sur un HPLC	76
Figure 19	Cinétique de la libération de pyridine-2-thione lors de la formation des AMC bispécifiques	77
Figure 20	Analyse des AMC bispécifiques sur une colonne de Superose-6	78
Figure 21	Détection des SEs par les Ac polyclonaux bispécifiques	79
Figure 22	Détection des SEs par l'AMC bispécifique	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A ₂₈₀ :	Absorbance à 280 nm
A ₃₄₃ :	Absorbance à 343 nm
Ac:	Anticorps
AFC:	Adjuvant de Freund complet
AFI:	Adjuvant de Freund incomplet
Ag:	Antigène
AMC:	Anticorps monoclonal
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA:	Cellule présentatrice d'antigène
D.C.:	Dichroïsme circulaire
DTT:	Dithiothréitol
ELISA:	«Enzyme-linked immunosorbent assay»
HAT:	Hypoxantine-aminoptérine-thymidine
HGPRT:	Hypoxantine guanine phosphoribosyl transférase
HPLC:	Chromatographie liquide à haute performance
HRP:	Péroxydase de Raifort
Ig:	Immunoglobuline
IgG:	Immunoglobulines G
IL-1:	Interleukine-1
IL-2:	Interleukine-2
IFN:	Interféron
IP:	Intrapéritonéal
IS:	Intrasplénique
IV:	Intraveineux

ND:	Non déterminé
ODP:	«Optimum density plate»
PBS:	Tampon phosphate salin
PEG:	Polyéthylèneglycol
PI:	Point isoélectrique
PM:	Poids moléculaire
RIA:	«Radio Immunoassay»
RPLA:	«Reverse passive latex agglutination»
rpm:	Rotations par minute
SC:	Sous cutané
SE(s):	Entérotoxine(s) de staphylocoques
SEA, SEB, SEC SED, SEE:	«Staphylococcal enterotoxin A» ou B, C, D, E
SFB:	Sérum foetal bovin
SPA:	Protéine A de staphylocoques
SPDP:	N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate
TMB:	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNB:	Thionitrobenzoate
TNF:	Facteur nécrosant des tumeurs
TSST-1:	Toxine du syndrome de choc toxique

SOMMAIRE

La détection des entérotoxines de staphylocoques (SE) dans les cultures bactériennes ou produits alimentaires se fait aujourd'hui par des méthodes immunologiques utilisant des anticorps (Ac) spécifiques à chaque SE. Comme toute entérotoxine peut produire une intoxication alimentaire, il serait très utile d'avoir un moyen permettant la détection de n'importe quelle toxine en un seul test.

Un tel test serait réalisable si un Ac reconnaissant toutes les SEs pouvait être obtenu. Les études d'homologie de séquences primaires des SEs ont montré qu'elles peuvent être classifiées en deux groupes d'homologie. Un premier est formé des SEB et SECs, et le deuxième comprend les SEA, SED et SEE. Les différences des structures primaires de chaque groupe de SEs supposent des structures antigéniques différentes. Il est donc fort peu probable qu'il existe un déterminant antigénique commun à toutes les SEs. Néanmoins, la construction d'un Ac bispécifique ayant des sites de reconnaissance dirigés contre chaque groupe d'homologie pourrait constituer un réactif immunologique capable de détecter la présence de chacune des SEs.

Les objectifs de notre projet de recherche étaient donc: de produire un anticorps monoclonal (AMC) capable de réagir

avec les SEA, SED et SEE; de produire un autre AMC réagissant avec SEB et les SECs; de les coupler chimiquement, pour obtenir un AMC bispécifique.

Quatre groupes de souris ont été immunisés avec différents mélanges de SEA, SED et SEE. Ces traitements ont été réalisés afin d'optimiser les chances d'obtenir des lymphocytes B sécrétant des Ac réagissant avec ces trois SEs. Les cellules issues des rates de chaque groupe de souris ont été fusionnées avec des cellules myélomateuses pour former des hybridomes. Des tests ELISA («enzyme-linked immunosorbent assay») ont permis de sélectionner les hybridomes sécrétant des Ac capables de réagir avec les trois SEs. Les hybridomes sélectionnés ont été clonés à deux reprises pour s'assurer de la monoclonalité des Ac sécrétés. Le clone D8A8F7 sécrétant les AMC ayant les meilleures réactions avec SEA, SED et SEE fut sélectionné et congelé jusqu'à utilisation ultérieure.

De la même manière une autre fusion cellulaire a été réalisée avec un groupe de souris ayant été immunisé avec un mélange de SEB et SEC₁. Le clone 2E11H1C7 en a été sélectionné pour la reconnaissance de SEB et des SECs par ses AMC.

Les hybridomes D8A8F7 et 2E11H1C7 ont été injectés intrapéritonéalement à des souris afin d'induire la production de liquide d'ascite riche en Ac. Les AMC contenus dans ces

liquides d'ascite ont été purifiés et caractérisés.

Contrairement au surnageant de culture de l'hybridome D8A8F7 qui réagissait avec SEA, SED et SEE, les AMC D8A8F7 isolés du liquide d'ascite ne réagissaient plus qu'avec SEA. Les AMC 2E11H1C7 isolés du liquide d'ascite, eux, ont réagi à la fois avec SEB et les SECs, comme le surnageant de culture.

Les AMC D8A8F7 et 2E11H1C7 ont été couplés avec le réactif chimique SPDP. Les AMC bispécifiques obtenus peuvent détecter des quantités similaires des mêmes SEs reconnues par les AMC avant le couplage chimique, soit jusqu'à 500 ng/mL de SEA, 30 ng/mL des SECs et 1 ng/mL de SEB.

L'AMC bispécifique obtenu ne reconnaît pas toutes les SEs tel qu'espéré. Cependant nous avons démontré qu'il était possible d'obtenir des AMC reconnaissant à la fois SEA, SED et SEE, ce qui suppose l'existence d'au moins un épitope commun à ces trois SEs. Un AMC reconnaissant SEB et les SECs a aussi été produit. Le couplage de ces deux AMC avec le SPDP ne modifie pas l'affinité de ceux-ci. Par conséquent il serait possible de construire un AMC bispécifique reconnaissant toutes les SEs, à condition d'avoir au préalable un AMC stable réagissant avec les SEA, SED et SEE, et un autre réagissant avec les SEB et SECs.

Cette possibilité de construction d'un Ac bispécifique capable de réagir avec toutes les SEs a néanmoins été démontrée en utilisant des Ac polyclonaux au lieu d'AMC.

INTRODUCTION

Depuis plus de 60 ans, il est connu que certaines intoxications alimentaires sont associées à l'ingestion de substances toxiques produites par S. aureus (DACK et al., 1930). Le terme entérotoxine fut introduit par WOOLPERT et DACK (1933) pour distinguer la toxine responsable des intoxications alimentaires, des autres toxines staphylococciques déjà connues.

Les études reliées aux intoxications alimentaires staphylococciques ont permis la découverte de plusieurs SEs. L'étude de leurs effets biologiques n'a apporté aucun moyen de diminuer les symptômes reliés à leur ingestion. L'étude de leurs propriétés physico-chimiques a permis de mettre au point différentes méthodes de purification. L'obtention de SEs purifiées, pratiquement libres de tout contaminant, a facilité la mise au point de plusieurs tests de détection, d'abord basés sur des méthodes biologiques, puis sur des méthodes immunologiques. Les SEs sont des protéines encore très étudiées, surtout pour leurs caractéristiques de superantigènes.

La mise au point par KÖHLER et MILSTEIN (1975) de la production d'anticorps monoclonaux a révolutionné la production de réactifs immunospécifiques. La détection des SEs par des tests ELISA utilisant des AMC est de plus en plus fréquente.

Les entérotoxines étant antigéniquement différentes, la répétition nécessaire des tests de détection spécifique devint un obstacle à surmonter. La connaissance des séquences d'acides aminés des SEs a permis de regrouper celles-ci en deux groupes d'homologie, le premier composé des SEA, SED et SEE, le second des SEB et des SECs. Ceci permet de supposer la présence d'épitopes communs, contre lesquels il pourrait être possible de produire des AMC.

Plusieurs chercheurs ont tenté en vain d'obtenir un AMC pouvant reconnaître toutes les SEs. Le but du présent travail est similaire mais utilise une approche différente. Plutôt que de chercher à obtenir un seul AMC reconnaissant toutes les SEs, nous voulons construire un Ac bispécifique ayant la même propriété. Cet Ac bispécifique sera obtenu par un couplage chimique d'un AMC reconnaissant le groupe d'homologie SEA, SED et SEE, ET d'un autre réagissant avec le groupe d'homologie SEB et SECs.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. INTRODUCTION: Staphylococcus aureus

1.1 Classification et identification

En 1880 un chirurgien écossais, sir Alexander Ogston, s'est aperçu que des cocci jouaient un rôle dans plusieurs infections pathogènes. Parmi ces cocci, certains formaient des amas semblables à des grappes de raisins qu'il a nommés Staphylococcus. Quelques années plus tard, ROSENBACH a réussi à faire croître des staphylocoques en culture pure. Ceci lui a permis de réaliser suffisamment d'études pour les identifier comme étant un genre distinct (BERGDOLL, 1989; BAIRD-PARKER, 1990).

Les staphylocoques sont des bactéries Gram positives, catalase positive qui se divisent en plus d'un plan. Ils se distinguent du genre Micrococcus du fait qu'ils ont la possibilité de croître dans des conditions anaérobies grâce à leur métabolisme fermenteur. On les retrouve fréquemment, comme plusieurs autres bactéries Gram positives, à la surface de la peau des animaux à sang chaud. La gorge et le nez sont des réservoirs importants de staphylocoques. Les différentes espèces de staphylocoques peuvent avoir des affinités particulières pour certaines espèces animales ou même pour certaines

parties anatomiques. L'espèce la plus étudiée est le S. aureus.

Les staphylocoques possèdent deux types de métabolisme, un respiratoire et un fermenteur. Ils peuvent croître à des températures variant de 7 à 48°C, leur croissance optimale se situant entre 35 et 40°C selon le pH environnant (HALPIN-DOHNALEK et MARTH, 1989). La plupart des souches peuvent croître à des pH variant de 4,5 à 9,3, les croissances optimales se situant à des pH variant de 7,0 à 7,5. La congélation peut endommager ces bactéries sans toutefois leur être létale. Leur grande capacité d'adaptation leur permet de survivre et de se multiplier dans divers milieux naturels ou synthétiques. On peut notamment en retrouver dans l'eau, l'air, le lait et différents types de nourriture (ex. salades, poulets, jambons, crémages, etc.)

1.2 Substances d'intérêt biologiques sécrétées par S. aureus.

S. aureus secrète plusieurs substances d'intérêt biologiques. Parmi celles-ci on retrouve entre autre plusieurs enzymes telles que des glycosidases, protéases, estérases, lipases, hyaluronidases, nucléases, coagulases et β -lactamases. On retrouve également des staphylosines, des leucocidines et la protéine A (SPA) qui peut se lier aux fragments Fc des immunoglobulines. Staphylococcus aureus secrète également plusieurs

toxines telles que les exotoxines pyrogéniques A, B et C, la toxine du syndrome de choc toxique (TSST-1) et les SEs.

2. LES ENTÉROTOXINES DE S. AUREUS

2.1 Généralités sur les entérotoxines

En 1914 BARBER fut le premier à démontrer une association entre la présence de staphylocoques dans la nourriture et certaines intoxications alimentaires. DACK et al. (1930) ont par la suite démontré que ces intoxications alimentaires étaient dues à des toxines filtrables qui ont été nommées entérotoxines à cause de leur action sur le système gastro-intestinal.

Les staphylocoques peuvent contaminer différents produits alimentaires. Selon la souche, il peut y avoir ou non production d'une ou plusieurs SEs, en plus ou moins grande quantité. La production d'entérotoxine se fait autant en condition aérobie qu'en condition anaérobie. La chaleur peut détruire les staphylocoques présent dans la nourriture sans inactiver les SEs déjà sécrétées. L'ingestion d'aliments contenant une certaine quantité de SEs amène l'individu à subir une intoxication alimentaire. Parmi les intoxications alimentaires générées par les microorganismes, celles dues au S. aureus occupent l'une des places les plus importantes (tableau I).

TABLEAU I: Incidence des empoisonnements alimentaires dus à S. aureus.*

PAYS	% DE L'EMPOISONNEMENT STAPHYLOCOCCIQUE PAR RAPPORT AU TOTAL DES INTOXICATIONS ALIMENTAIRES
Angleterre et Pays de Galles (1969-1976)	2,6
Écosse (1973-1977)	4,2
USA (1972-1976)	32,6
Canada (1973-1975)	44,7
Australie (1967-1971)	27,3
Japon (1969-1975)	28,4
Hongrie (1960-1968)	56,1
Finlande (1965-1974)	50,6

*D'après TURNBULL (1979).

Les Staphylocoques sécrètent plusieurs entérotoxines (SEs) qui causent des intoxications alimentaires. À ce jour, sept SEs différentes ont été identifiées par l'utilisation de méthodes immunologiques (BERGDOLL et al., 1959; CASMAN, 1960; BERGDOLL et al., 1965; CASMAN et al., 1967; BERGDOLL et al., 1973).. Elles ont été nommées A, B, C₁, C₂, C₃, D, et E (SEA, SEB, SEC₁, etc.).

De façon générale, les SEB et SECs sont produites en plus grandes quantités selon les conditions du milieu. Elles sont sécrétées surtout pendant la phase stationnaire de croissance bactérienne. Les gènes exprimant ces protéines seraient liés à un contrôle plasmidique (SHALITA et al., 1977). Quoique produites en quantité moindre, les SEA, SED et SEE sont responsables de la plupart des cas d'intoxications alimentaires (surtout SEA). Celles-ci sont produites pendant la phase logarithmique de la croissance bactérienne. L'expression de leurs gènes semble être contrôlée par le chromosome bactérien lui-même (SHAFER et IANDOLO, 1978; IANDOLO, 1989).

2.2 Propriétés physico-chimiques des entérotoxines

Afin de pouvoir mieux étudier les différentes propriétés des SEs, des techniques de purification ont été mises au point. Les premières utilisaient des résines échangeuses d'ions accompagnées de précipitations (BERGDOLL et al., 1959). Les

techniques maintenant couramment employées permettent un bon rendement tout en ayant peu d'étapes. Parmi celles-ci on retrouve l'utilisation de la chromatographie de type «dye-ligand» (TRANTER et BREHM, 1990) et d'immunoaffinité (LAPEYRE et al., 1987; MICUSAN et al., 1992).

Les séquences nucléotidiques des gènes codant pour les SEs sont maintenant connues. Certains de ces gènes ont été incorporés chez *E. coli*, pour produire des SEs recombinantes (JONES et KHAN, 1986; BOHACH et SCHLIEVERT, 1987a; BETLEY et MEKALANOS, 1988; COUCH et al., 1988; BAYLES et IANDOLO, 1989). Quoique cette nouvelle technologie ait un taux de production de SEs faible, il y a bon espoir que les difficultés rencontrées soient surmontées d'ici peu de temps.

Les entérotoxines sont des protéines simples, de faibles poids moléculaires (PM), solubles dans l'eau et dans les solutions salines. Leurs points isoélectriques (pI) varient de 7,0 à 8,6 (BERGDOLL, 1983).

Parmi les SEs, on retrouve deux grands groupes ayant des homologies de séquences d'acides aminés. Un premier regroupe les SECs, n'ayant que quelques acides aminés différents entre elles, et SEB avec qui elles ont environ 80% d'homologie. Le second groupe comprend les trois autres SEs, soit: SEA, SED et SEE. SEA et SEE sont homologues entre elles à environ 90%, et

à 70% avec SED (tableau II). Des études utilisant le dichroïsme circulaire (D.C.) et la spectroscopie de fluorescence ont tenté de déterminer les structures secondaires et tertiaires des SEs (SINGH et al., 1988; SINGH et BETLEY, 1989). Le tableau III résume les principales propriétés physico-chimiques des SEs.

De façon générale les SEs sont résistantes à la chaleur ainsi qu'aux variations de pH (BERGDOLL, 1989). Toutes les SEs possèdent deux résidus cystéine liés par un pont disulfure formant une boucle. Les entérotoxines résistent à la plupart des enzymes protéolytiques connues, telles que la trypsine, la papaïne, la pepsine, la chymotrypsine ainsi que la rénine. Les SEs ne sont donc pas inactivées lors de leur passage dans le tractus digestif. Il est cependant possible de cliver certaines SEs dans des conditions de pH extrême tel qu'avec de la pepsine à pH inférieur à 2 ou avec de la trypsine à des valeurs de pH supérieures à 9 (BERGDOLL, 1970; SPERO et al., 1973; SCHMIDT et SPERO, 1983).

2.3 Propriétés biologiques des entérotoxines

Lorsque des aliments sont contaminés par des staphylocoques sécrétant d'entérotoxines, ceux-ci ont la même apparence, la même odeur et le même goût. Cependant les individus ayant consommé de tels aliments éprouveront certains malaises dans

TABLEAU II: Homologie des séquences d'acides aminés entre les différentes entérotoxines^{1,2}

	SEA	SEB	SEC₁	SED	SEE
SEA	100	58,9	54,5	71,4	92,2
SEB		100	77,8	57,9	55,6
SEC₁			100	51,3	51,6
SED				100	72,4
SEE					100

¹ Calculé à partir du programme Bestfit (GCG Sequence Analysis Software Package, Genetics Computer Inc.)

² Adapté de MICUSAN et THIBODEAU, 1992

TABLEAU III: Principales propriétés physico-chimiques des entérotoxines staphylococciques.

Propriétés	Entérotoxines					
	A	B	C ₁	D	E	
Coefficient de sédimentation (S _{20,w})	3,0	2,89	3,0	-	2,6	
Poids moléculaire	27078	28366	27500	26360	26425	
Nombre de résidu d'acides aminés	233	236	239	228	230	
Point isoélectrique	7,3	8,6	8,6	7,4	7,0	
Résidu N-terminal	Ser	Glu	Glu	Ser	Ser	
Résidu C-terminal	Ser	Lys	Gly	Lys	Thr	
séquençage des acides aminés	+	+	+	-	-	
séquençage des nucléotides	+	+	+	+	+	
structures D.C. (%)	hélice- α	10,0	9,5	15,0	6,5	6,2
	feuillet- β	84,5	55,0	38,0	78,0	51,2
	tour- β	0,0	16,5	25,0	1,5	9,0
	apériodicité	5,5	19,0	21,5	14,0	33,5

D'après

- | | | |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| - AVENA et BERGDOLL, 1967 | - BOHACH et SCHLIEVERT, 1987b | - HUANG et BERGDOLL, 1970 |
| - BAYLES et IANDOLO, 1989 | - BORJA <u>et al.</u> , 1972 | - JONES et KHAN, 1986 |
| - BERGDOLL <u>et al.</u> , 1965 | - BORJA et BERGDOLL, 1967 | - REISER <u>et al.</u> , 1984 |
| - BETLEY et MEKALANOS, 1988 | - CHANG et BERGDOLL, 1979 | - SCHANTZ <u>et al.</u> , 1972 |
| - COUCH <u>et al.</u> , 1988 | - SCHMIDT et SPERO, 1983 | |
| - BOHACH et SCHLIEVERT, 1987a | - HUANG <u>et al.</u> , 1987 | |

les heures suivantes (généralement une à six heures après l'ingestion). Des nausées apparaissent suivies de vomissements. La réaction émétique se produit régulièrement, à une fréquence variant entre 5 et 21 minutes, ceci pendant une à huit heures. Les autres symptômes courants sont les crampes abdominales et la diarrhée (DENNISON, 1936). Bergdoll résume une intoxication alimentaire due aux SEs comme suit: " Au début vous croyez que vous allez en mourir, puis au fil des heures, vous espérez en mourir... tout en sachant que ça ne sera pas le cas" (BERGDOLL, 1983).

La gravité des symptômes dépend de la quantité de SE ingérée et de la résistance naturelle de l'individu. Seuls les humains et les primates sont sensibles aux intoxications alimentaires d'origine staphylococcique. Les rongeurs pour leur part y sont particulièrement résistants. Des études faites à partir de SEs purifiées, sur des volontaires humains, estiment que l'ingestion de 1 à 5 μg de SEs/70 kg (poids corporel) sont nécessaires pour causer une intoxication alimentaire. Normalement, si le seuil de tolérance n'est pas dépassé, aucun symptôme ne se manifeste. Les cas graves peuvent être accompagnés de fièvre, de variations de pression sanguine, de maux de tête, de crampes musculaires, etc. Un rétablissement complet prend de 24 à 48 heures. La mort par intoxication alimentaire causée par des SEs est un phénomène rare, les quelques cas reportés concernent surtout de jeunes

enfants ou des personnes âgées (BERGDOLL, 1989).

Des travaux effectués par SUGIYAMA et HAYAMA en 1965 ont associé le site de l'action émétique aux viscères abdominaux, la transmission du message jusqu'au centre de vomissement cervical se faisant via le nerf vague.

De 15% à 35% des humains sont des porteurs persistants de S. aureus et peuvent ainsi contaminer de la nourriture (WILLIAMS, 1963). Il n'existe encore aucun moyen pour arrêter ou même diminuer les symptômes dus à l'ingestion d'entérotoxines; on ne peut qu'en subir les conséquences. Les entérotoxines sont résistantes à la chaleur et ne sont pas inactivées par la pasteurisation. Les seuls moyens pour diminuer le taux de telles intoxications alimentaires restent la prévention par réfrigération des aliments et la détection des aliments contaminés.

2.4 Propriétés immunologiques des entérotoxines

L'intérêt pour les propriétés immunologiques des SEs a débuté en 1970 lorsque PEAVY et al. ont observé que la SEB induisait la prolifération des lymphocytes périphériques humains ainsi que des cellules issues de rates de souris. Quelques années plus tard, il a été démontré que seulement la prolifération des lymphocytes T était induite par les SEs

(GREAVES et al., 1974; SMITH et JOHNSON, 1975). Le pouvoir mitogène des SEs s'est révélé encore plus puissant que celui des lectines (LANDFORD et al., 1978). Les SEs activent autant les cellules T auxiliaires que cytotoxiques (ARCHER et al., 1981; DONNELLY et ROGERS, 1982). L'intensité du pouvoir mitogène varie d'une SE à l'autre; le groupe de UCHIYAMA (1989) ont démontré que la SEA avait un pouvoir mitogène supérieur à SEB et SEC₁. CARLSON et al. (1988) ont observé que la stimulation des lymphocytes T par les SEs nécessitait la présence de cellules accessoires. FLEISHER et SCHREZENMEIER (1988) ainsi que MOLLICK et al. (1989) ont démontré que ces cellules accessoires devaient exprimer à leur surface des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Ainsi, les SEs peuvent stimuler environ une cellule T sur cinq alors qu'un antigène (Ag) normal n'en stimule qu'une sur 10 000. Ce pouvoir mitogénique à large spectre, couplé à la découverte que les SEs n'avaient pas besoin d'être dégradées par les cellules présentatrices d'Ag (CPA) pour induire une prolifération, a mené WHITE et al. (1989) à élaborer le concept de superantigène. Des travaux effectués par DELLABONA et al. (1990) et RUSSEL et al. (1991) ont prouvé que la liaison des SEs avec les molécules de classe II du CMH se produisait à l'extérieur de la niche présentatrice d'Ag. La stimulation des lymphocytes T par les SEs n'est cependant pas restreinte par le CMH (CHALITA et GEHA, 1992). Il a également été démontré que les SEs se liaient à certaines portions de V β présentes sur les récepteurs

des cellules T (KAPPLER et al., 1989; WHITE et al., 1989).

Les SEs possèdent également la propriété d'augmenter la sécrétion de plusieurs cytokines telles que les interleukines 1 et 2 (IL-1, IL-2), les interférons gamma (IFN γ) et le facteur nécrosant des tumeurs (TNF) (JOHNSON et al., 1977; FAST et al., 1989; UCHIYAMA et al., 1989).

Les SEs provoquent aussi une immunosuppression; particulièrement au niveau de la production d'Ac contre les Ag thymodépendants (SMITH et JOHNSON, 1975; PINTO et al., 1978; KAWAGUCHI-NAGATA et al., 1985).

3. DÉTECTION DES ENTÉROTOXINES

3.1 Tests biologiques

Lors de la découverte des entérotoxines staphylococciques comme agents provocateurs d'intoxications alimentaires, les seuls moyens de détection étaient reliés à l'utilisation d'animaux. Par exemple, des échantillons potentiellement contaminés étaient injectés de façon intrapéritonéale ou intraveineuse à des chatons; une réaction émétique traduisait la présence d'entérotoxines (DOLMAN et WILSON, 1940; HAMMON, 1941). Des réactions non spécifiques avec d'autres substances staphylococciques ont mené à la déléation de cette méthode.

Parmi les tests utilisant des animaux, le plus employé fut l'injection intragastrique d'échantillons possiblement contaminés à de jeunes singes Rhésus (SURGELLA et al., 1953). Des vomissements de l'animal signifient que l'échantillon contient des SEs, sans pouvoir identifier de quel type il s'agit. Les principaux désavantages de ce test sont les coûts d'achat et d'entretien de ces animaux, ainsi que le développement d'une tolérance progressive aux SEs.

Une autre méthode biologique suggérée par SCHREUBER et al. (1983) utilise des cobayes hypersensibilisés aux SEs. L'injection intradermique de SEs provoque une réaction d'hypersensibilité visible à l'oeil nu en 15 minutes. Ce test permet des mesures semi-quantitatives, ayant une limite de détection de 10 pg de SE. Quoique pratique pour vérifier l'activité biologique de SEs, ce test est peu commode lorsqu'il s'agit de tester un grand nombre d'échantillons de faibles concentrations. Ce test ne donne aucun renseignement sur le type de SEs présentes.

3.2 Tests immunologiques

La purification des SEs et la production d'Ac spécifiques ont permis la venue d'une batterie de tests immunologiques permettant leur détection. Les Ac ne détectent pas l'activité biologique des SEs mais plutôt leur antigénicité. Aujourd'hui

tous les tests de détection des SEs sont basés sur les réactions avec des Ac qui leur sont spécifiques.

Le premier test basé sur une réaction Ag-Ac utilisé pour détecter la présence de SEs a été basé sur l'immunodiffusion de type Ouchterlony (OUCHTERLONY, 1958). Les échantillons (SEs) et des Ac anti-SEs sont déposés dans des puits différents pratiqués dans un gel d'agarose. Les Ac et les SEs diffusent dans le gel, une bande de précipitation indique la présence de SEs. Cette méthode permet une estimation semi-quantitative des SEs jusqu'à 5 $\mu\text{g/mL}$. Ce test a été modifié à plusieurs reprises. L'une des variantes, l'ODP («optimum density plate») (DONNELLY et al., 1967; ROBBINS et al., 1974), permet d'augmenter la sensibilité de détection jusqu'à 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

La miniaturisation de la précédente technique a permis d'augmenter la sensibilité jusqu'à 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (REISER et al., 1974). La concentration nécessaire des échantillons requiert cependant beaucoup de temps.

Une méthode de détection semi-quantitative par électroimmunodiffusion a aussi été mise au point (GASPER et al., 1973). Le principal défaut de cette technique est l'utilisation de grandes quantités d'antisérum.

Il a été proposé que les tests de détection des SEs

devaient déceler jusqu'à 1 ng de SE par gramme de nourriture contaminée (BERGDOLL, 1970). Des tests plus sensibles ont donc été mis au point.

Parmi ceux-ci, on retrouve les tests d'hémagglutination, détectant jusqu'à 1 ng de SE (MORSE et MAH, 1967). À des puits contenant une quantité constante d'Ac anti-SEs, sont ajoutés des dilutions d'échantillons. Puis on ajoute des érythrocytes à la surface desquels des SEs ont préalablement été fixées. Les Ac libres agglutinent les globules rouges recouverts de SEs. La concentration de SEs présente est inversement proportionnelle au taux d'agglutination.

L'autre version de ce test est appelée «Reverse Passive Latex Agglutination» (RPLA) (SILVERMAN et al., 1968; BERGDOLL et al., 1976). Ici ce sont les Ac qui sont couplés aux érythrocytes. L'agglutination se produit lorsqu'il y a présence de SEs. Les problèmes rencontrés avec ce type de tests sont la difficulté de couplage des Ac aux érythrocytes et les réactions non spécifiques se produisant avec les extraits alimentaires. Une trousse commerciale de ce test est disponible (SHINGAKI et al., 1981).

Les tests de RIA («Radio Immunoassay») rapides et très sensibles, ont rendu possible la détection de 1 ng de SE dans un gramme de nourriture (JOHNSON et al., 1971; COLLINS et al.,

1973). Les Ac anti-SEs sont fixés au fond des 96 puits d'un plateau et une quantité connue de SEs marquées radioactivement compétitionnent avec les échantillons à tester. Les désavantages de ce test sont les réactions non spécifiques possibles; l'utilisation de matériel radioactif ayant une durée de vie limitée, les risques pour la santé qu'entraîne les manipulations, ainsi que l'équipement spécialisé nécessaire aux lectures des résultats.

L'alternative de choix à toutes ces techniques est le test de type ELISA («Enzyme-Linked Immunosorbent Assay»), basé sur un principe similaire à celui de RIA. On utilise des anticorps anti-SE couplés à une enzyme pour détecter la présence de SEs (SAUNDERS et BARTLETT, 1977; STIFFLER-ROSENBERG et FEY, 1978; NOTERMANS et HEUVELMAN, 1983). Ce test est aussi sensible et rapide que le RIA. Une trousse commerciale est d'ailleurs disponible (FEY et al., 1984) pour la détection des SEA, SEB, SECs et SED. Des interférences peuvent se produire, par exemple la SPA peut se lier aux portions Fc des Ac et produire des résultats faussement positifs. On évite ce genre de problèmes en utilisant des Ac dont la partie Fc a été dégradée [fragments $F(ab')_2$], ou en faisant au préalable réagir les échantillons à tester avec un sérum normal de lapin.

4. ANTICORPS MONOCLONAUX

4.1 Introduction

Différents lymphocytes B sont stimulés par des sites antigéniques spécifiques à leurs immunoglobulines de surface. Chaque stimulation amène la multiplication d'un clone cellulaire et la production d'un Ac particulier à ce clone. Les Ac produits par plusieurs clones sont donc polyclonaux. L'isolement d'une seule lignée de lymphocytes B donnerait une source d'Ac identiques (monoclonaux) réagissant contre un seul déterminant antigénique. Ces cellules-B ne possèdent pas la capacité de se diviser continuellement et ne peuvent donc pas être mises en cultures.

Les premiers à avoir produit des AMC ont été KOHLER et MILSTEIN (1975). Ceux-ci après avoir immunisé des souris avec des globules rouges de mouton, ont fusionné les cellules de rates (source de lymphocytes B) avec une lignée de cellules myélomateuses (cellules pouvant survivre indéfiniment en milieu de culture) déficientes pour l'enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT). La sélection des cellules fusionnées se fait dans un milieu contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine (milieu HAT). L'aminoptérine bloque la voie principale de synthèse de l'ADN et de l'ARN. La présence dans le milieu de thymidine et d'hypoxan-

thine permet aux cellules d'utiliser une voie de biosynthèse alternative en utilisant l'enzyme HGPRT. Les myélomes non fusionnés déficients pour cet enzyme ne peuvent pas utiliser cette alternative. Les cellules B non fusionnées meurent après quelques cycles de multiplication. Seules les cellules hybrides lymphocytes-B-myélomes (hybridomes) peuvent survivre dans un tel milieu. Ils ont donc obtenu une lignée de lymphocytes B immortelle sécrétant des Ac spécifiques aux érythrocytes de mouton.

Les principaux avantages des AMC sont leur spécificité et leur monoclonalité. Il est donc possible d'obtenir de grandes quantités d'AMC spécifiques à un seul déterminant antigénique. Les Ac polyclonaux sont variables d'un animal à l'autre. Les hybridomes, eux, peuvent servir de source constante et inépuisable d'un même anticorps. Le schéma général pour la production des AMC est présenté à la figure 1.

4.2 Utilisation des anticorps monoclonaux pour la détection des entérotoxines

L'utilisation d'AMC anti-SEs dans les tests de détection de type ELISA permet de standardiser les protocoles d'utilisation. Il est possible de produire des AMC spécifiques à chaque type de SE. Plusieurs groupes de chercheurs ont produit différents AMC spécifiques aux SEs en utilisant divers protoco-

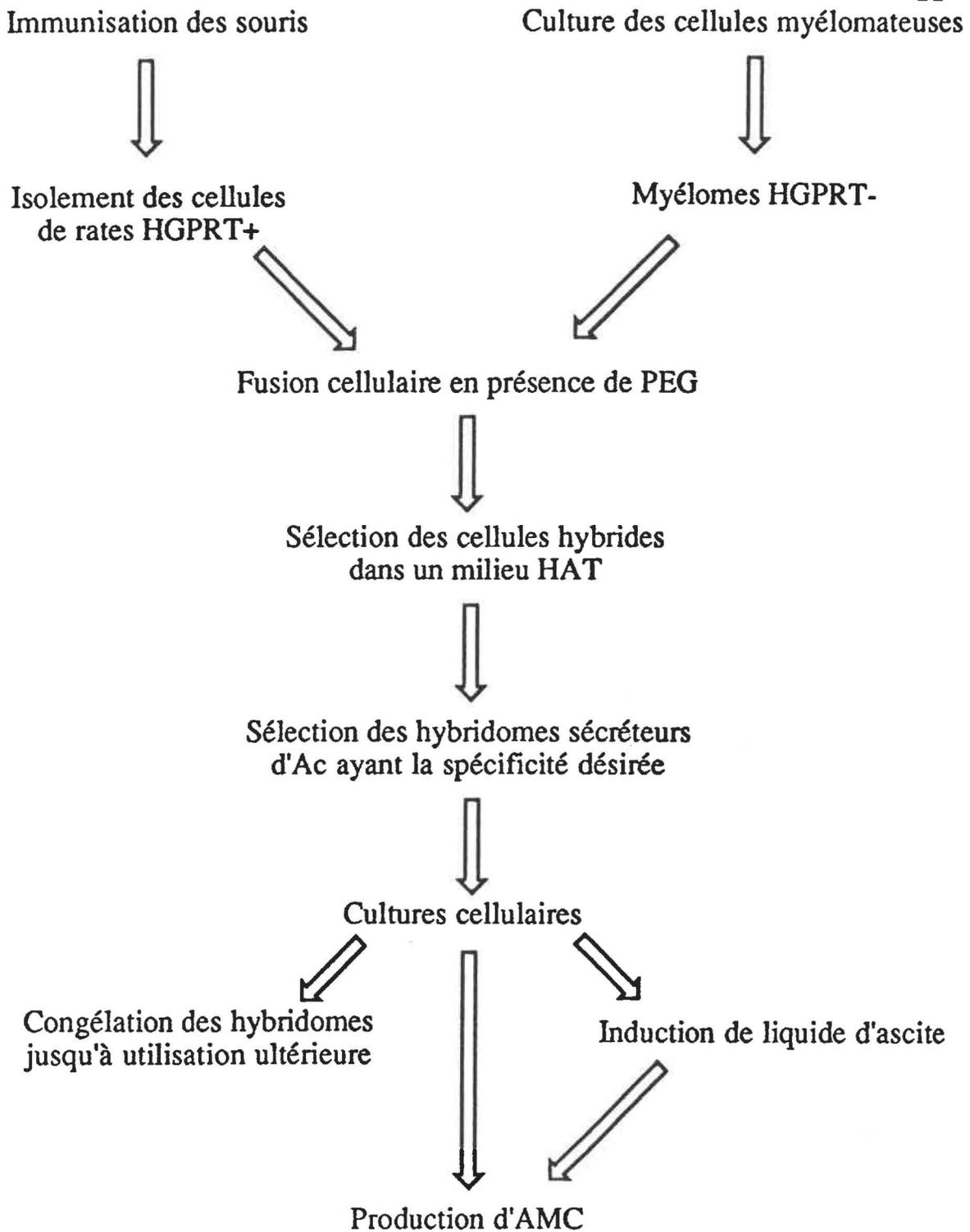


Fig.1 Schéma représentant la génération d'hybridomes ainsi que la production d'AMC

les d'immunisation.

Généralement on obtient des AMC spécifiques à l'entérotoxine utilisée lors de l'immunisation. Cependant quelques chercheurs tels EDWIN et al. (1984) ont obtenu des AMC qui en plus de réagir avec l'entérotoxine désirée (SEA), avaient une réaction croisée avec SEE. Ces deux SEs font partie du même groupe d'homologie et possèdent possiblement un épitope commun ou semblable. THOMPSON et al. (1984) ont obtenu des AMC réagissant à la fois avec SEB et les SECs, laissant supposer la présence d'épitopes communs à l'intérieur de cet autre groupe d'homologie.

MEYER et al. (1984) ont été les premiers à utiliser alternativement deux entérotoxines (SEA et SED) lors de l'immunisation des souris. Suite à la fusion cellulaire, 65 hybridomes ont été obtenus sur une possibilité de 149. De ces 65 hybridomes, 30 sécrétaient des Ac réagissant contre SEA, 11 avaient des réactions positives avec SEA et SED, et aucun n'était spécifique qu'à SED. L'un des AMC obtenus réagissait avec toutes les SEs, particulièrement avec SEB et SEC₁, même si ces SEs n'avaient pas servi lors de l'immunisation. Des tests d'inhibition ont confirmé la plus grande affinité de l'AMC pour SEB et SEC₁ que pour les autres SEs. L'existence d'un tel AMC réagissant contre toutes les SEs ayant soulevé un vif intérêt, l'AMC fut étudié dans d'autres laboratoires. Il a été démontré

qu'en plus de reconnaître toutes les SEs, cet AMC réagissait avec plusieurs autres protéines de provenances diverses (THOMPSON et al., 1985). Cet AMC n'étant pas spécifique aux SEs, l'intérêt qu'il avait soulevé disparut rapidement.

Un autre AMC réagissant avec plusieurs SEs a été obtenu par LAPEYRE et al. (1987). Cet AMC réagirait contre les SEA, SEB, SEC₁ et SED. Les auteurs ne donnent pratiquement aucune information sur l'obtention de cet AMC, ni sur sa caractérisation. Dû au manque d'information, l'interprétation des résultats fournis reste douteuse.

En 1991, SHINAGAWA et al. ont produit des AMC reconnaissant plusieurs SEs, trois d'entre eux réagiraient contre toutes les SEs. En examinant attentivement leurs résultats on découvre que ceux-ci n'ont qu'une faible affinité pour les SEs. Aucune information n'est donnée concernant les réactions possibles de ces AMC avec d'autres protéines d'origine bactérienne.

5. LES ANTICORPS BISPÉCIFIQUES

Les Ac sont des molécules spécifiques ayant deux sites de liaison identiques pour un Ag donné. Il est désormais possible de produire des Ac ayant une double spécificité (deux site de liaison différents) soit par des méthodes biologiques ou

chimiques. La formation d'Ac bispécifiques a été réalisée pour la première fois par NISONOFF et RIVERS (1961) en couplant chimiquement deux Ac polyclonaux de spécificités différentes.

5.1 Méthodes biologiques.

COTTON et MILSTEIN (1973) ont été les premiers à fusionner deux lignées cellulaires sécrétrices d'immunoglobulines (Ig). Les cellules hybrides formées sécrétaient des Ig provenant des deux types parentaux. Le mélange d'Ac obtenu de spécificité inconnue s'est alors révélé de peu d'utilité. Cette technique a été améliorée par KOHLER et MILSTEIN (1975), permettant l'obtention d'une lignée cellulaire continue sécrétrice d'AMC spécifique à un Ag. L'utilisation de ces techniques de fusions cellulaires pour produire des AMC bispécifiques a été mise au point en 1980 par READING (brevet U.S. 4 474 893). La description de la technique permettant l'obtention de quadromes sécréteurs d'AMC bispécifiques réagissant avec deux Ag connus a été publiée l'année suivante (READING, 1981).

En 1983, MILSTEIN et CUELLO ont mis au point une technique de production d'AMC bispécifiques semblable. Ils ont fusionné un hybridome sécrétant des AMC spécifiques à un Ag avec des cellules de rate de souris immunisées avec un second Ag. Les cellules hybrides obtenues sont appelées triomes puisque

originaires de trois cellules mères.

La production de triomes quoique moins complexe que la production de quadromes, ne nous assure en aucun cas de la deuxième spécificité qui sera obtenue. Ces deux techniques ont le désavantage commun de sécréter un mélange des Ac parentaux parmi lesquels se retrouvent les AMC bispécifiques. Le mélange d'AMC obtenus a été analysé par MILSTEIN et CUELLO (1984). Chaque Ac sécrété est formé de l'assemblage aléatoire des chaînes lourdes et légères produites par les gènes des cellules mères. La figure 2 illustre la composition du mélange d'Ac sécrétés par les triomes et les quadromes. Ils ont estimé que les Ac bispécifiques fonctionnels formés constituaient de 12,5 à 50% du mélange d'Ac produit. La purification de ces AMC bispécifiques est fastidieuse.

5.2 Méthodes chimiques

Les méthodes chimiques utilisent des Ac purifiés plutôt que les cellules productrices. Ces méthodes se divisent en deux groupes: celles qui séparent les deux sites de combinaisons des Ac avant de former des Ac bispécifiques et celles qui utilisent les Ac entiers.

La première méthode de couplage chimique de deux Ac a été proposée par NISONOFF et RIVERS (1961). En résumé, ils ont

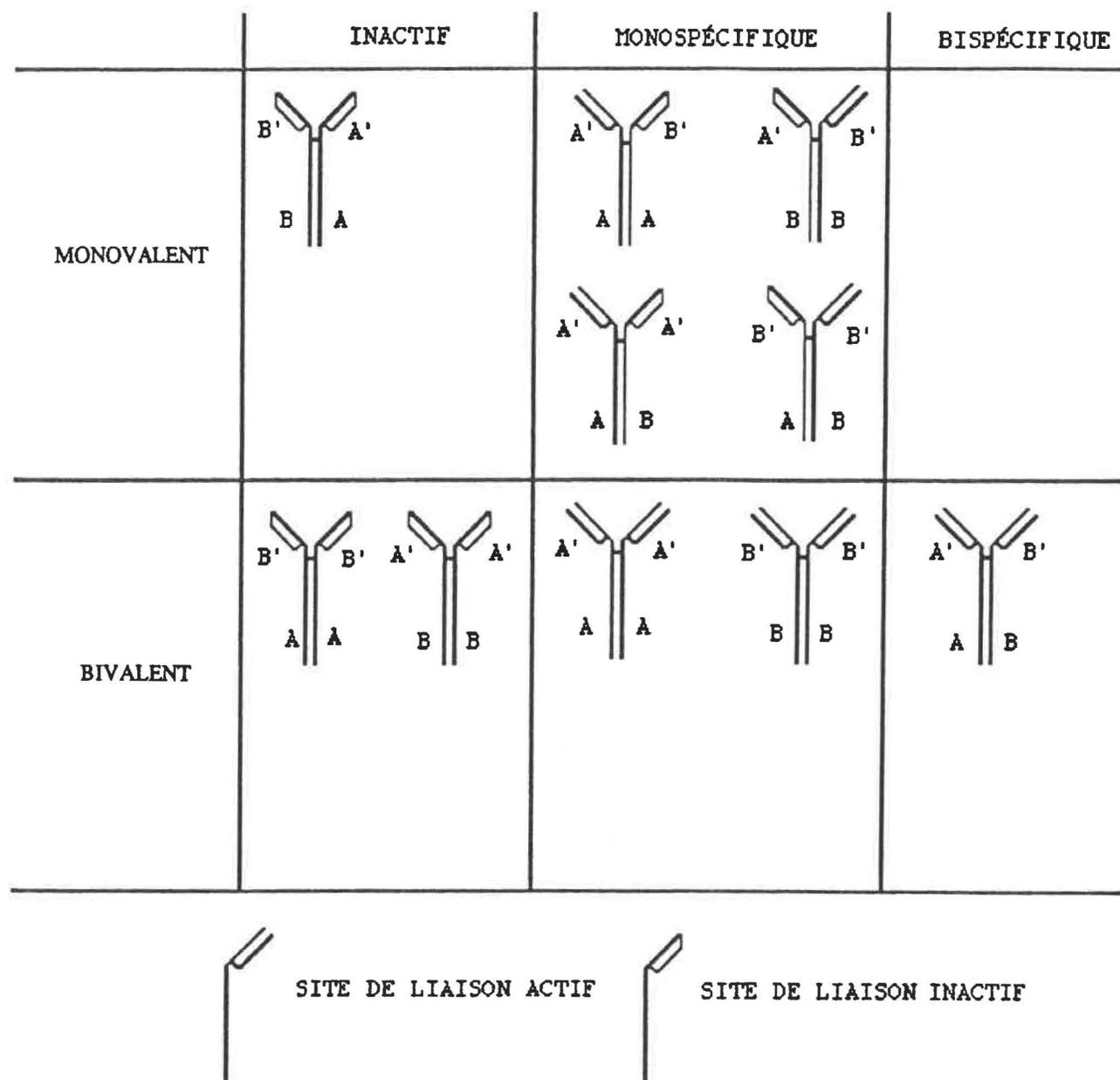


Fig. 2 Composition du mélange d'Ac sécrétés par les triomes et quadromes

digéré à la pepsine chacun des deux Ac polyclonaux utilisés pour obtenir des fragments $F(ab')_2$. Une réduction modérée de ces fragments leur a permis d'obtenir des fragments $F(ab')$. Les fragments $F(ab')$ de chaque Ac ont été couplés par l'oxydation de leurs ponts disulfures. Le mélange obtenu contient une bonne proportion d'Ac bispécifiques. Cette méthode est limitée par la nature polyclonale des Ac utilisés.

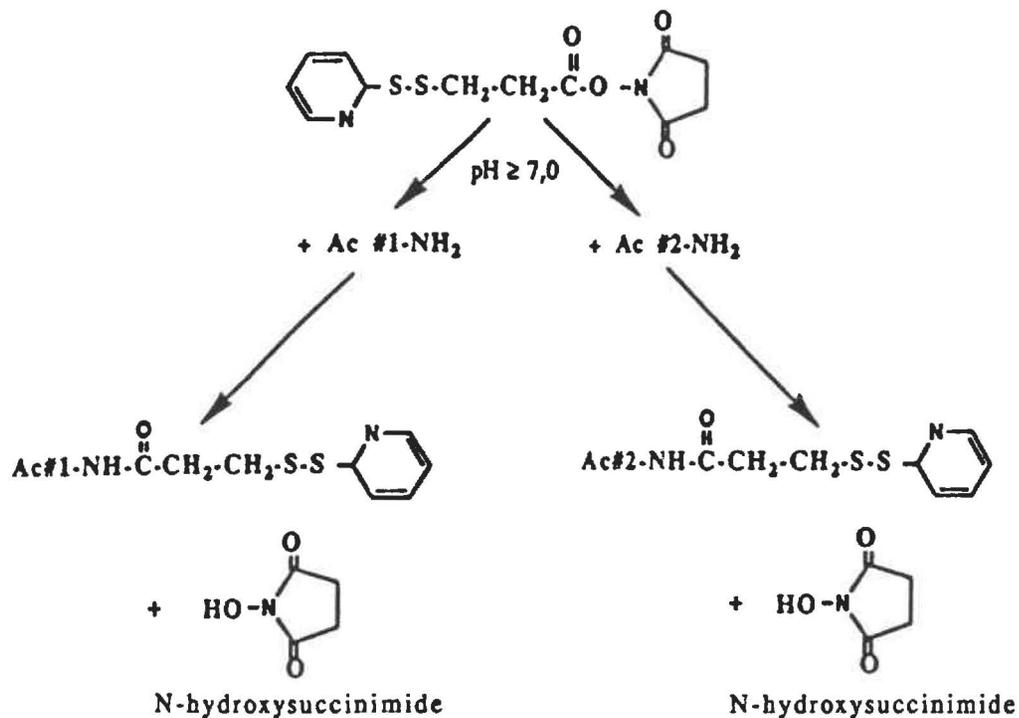
BRENNAN et al. (1985) ont aussi utilisé les fragments $F(ab')_2$ des Ac. Ces fragments ont été réduits par une réaction avec la mercaptoéthylamine et de l'arsénite de sodium pour former deux fragments $F(ab)$ identiques. La formation de liens disulfures à l'intérieur d'un même fragment $F(ab)$ a été évitée par une réaction avec l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) (réactif de Ellman). Des dérivés de thionitrobenzionate (TNB) stables ont été formés [$F(ab)$ -TNB]. Les groupements TNB de l'un des deux Ac ont été réduits avec du 2-mercaptoéthylamine pour former des résidus thiols [$F(ab)$ -SH]. Les fragments $F(ab)$ -TNB spécifiques à un premier Ag ont été mélangés de façon équimolaire aux fragments $F(ab)$ -SH spécifiques au second Ag. Les anticorps bispécifiques obtenus reconnaissaient les deux Ag différents.

GLENNIE et al. (1987) ont décrit une autre méthode chimique pour la formation d'AMC bispécifique. Les premières étapes consistent à produire des fragments $F(ab)$ -SH de la même manière

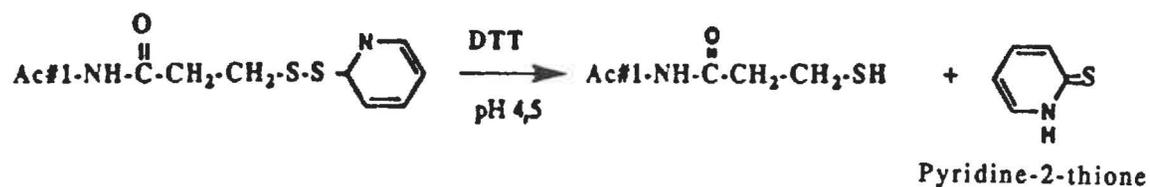
que l'équipe de Brennan. Subséquemment, tous les groupements thiols libres de l'un des Ac ont subi une maléimidation avec le réactif bifonctionnel O-phénylène-dimaléimide (O-PDM) en obtenant F(ab)mal. Les F(ab)-SH et les F(ab)mal ont été combinés dans des conditions favorisant la réaction entre les groupements thiols et les groupements maléides tout en minimisant la réoxydation des groupements thiols.

D'autres méthodes utilisent des Ac entiers. L'une des plus utilisée permet l'obtention d'Ac bispécifiques par une réaction avec le réactif hétérofonctionnel N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) (CARLSON et al., 1978; KARPOVSKY et al. 1984; LIU et al. 1985; NITTA et al. 1989). Dans une première étape, le SPDP est ajouté à chacun des deux Ac sélectionnés afin qu'il puisse se fixer sur les chaînes latérales de certains acides aminés. Les molécules de 2-pyridyl disulphyde fixées à l'un des deux Ac sont réduites par l'action du dithiothréitol (DTT) amenant la libération de résidus N-hydroxysuccinimide. Les Ac bispécifiques sont obtenus par la mise en contact des Ac couplés au SPDP qui ont été réduits et ceux qui ne l'ont pas été. Les groupements thiols issus de la réduction au DTT réagissent avec les molécules de SPDP non réduites au niveau du pont disulfure restant pour former un lien covalent stable et libérer des molécules de pyridine-2-thione (fig.3). Cette dernière méthode comporte l'avantage de travailler avec des Ac purifiés entiers,

A) INTRODUCTION DES GROUPES 2-PYRIDYL-DISULPHYDE À CHAQUE Ac



B) RÉDUCTION DE L'UN DES DÉRIVÉS SPDP-ANTICORPS



C) OBTENTION DU CONJUGUÉ Ac#1-Ac#2

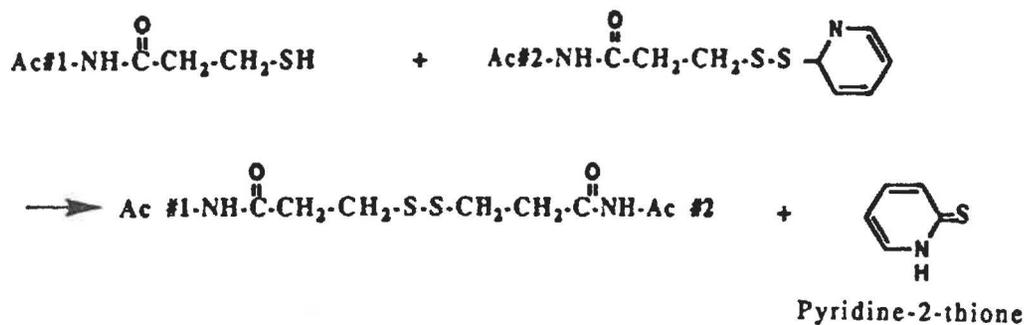


Fig.3 Schéma du couplage de deux Ac à l'aide du SPDP

et seuls des hétérodimères sont formés lors de la réaction de couplage. C'est la méthode que nous avons choisie pour la construction d'Ac bispécifiques.

OBJECTIF DE LA RECHERCHE

Ce travail vise à produire un réactif immunologique capable de permettre une détection rapide de toutes les SEs. Nous espérons pouvoir obtenir un tel réactif en construisant un AMC bispécifique.

La première étape consiste à produire un AMC réagissant avec SEA, SED et SEE. Ces trois SEs ayant des homologies de séquences d'acides aminés supérieures à 70%, il est probable qu'elles possèdent au moins un épitope commun ou semblable.

Un second AMC, celui-ci reconnaissant les SEB et SECs devra aussi être produit. Une homologie des séquences primaires de ces SEs suppose aussi la présence d'épitopes communs ou semblables.

Ces deux AMC devront être couplés avec le réactif hétérofonctionnel SPDP. Les AMC bispécifiques ainsi obtenus serviront de premiers Ac dans un test de type ELISA pour la détection des différentes SEs.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

1.1 Immunisation des souris

Différents mélanges de SEs purifiées (Toxin Technology, Sarassota, FL) ont été inoculés en présence ou absence d'adjuvant de Freund complet (AFC) ou incomplet (AFI) à cinq groupes de souris femelles BALB/c (Charles Rivers, Saint-Constant, Québec, Canada) de 18 à 20 g. Le tableau IV montre le protocole d'immunisation utilisé pour chaque groupe de souris.

1.2 Production des hybridomes

Les opérations suivantes ont été effectuées dans le laboratoire du Dr Jacqueline Lecomte de l'Institut Armand-Frappier.

Quatre jours après la dernière immunisation de rappel, les souris d'un même groupe ont été endormies au méthophane. Sous un laminaire (Biogard Hood), chacune d'entre elles a été saignée à blanc par ponction cardiaque. Les rates ont été prélevées stérilement puis triturées par rotation d'un piston de seringue 1cc dans 2 mL de RPMI sans sérum (pyruvate de

TABLEAU IV: Schéma d'immunisation des souris

GRUPE	NOMBRE DE SOURIS	JOUR	MÉLANGE INJECTÉ A CHAQUE SOURIS	INJECTION
FA-1.1	2	0	2,5 µg SEA + 2,5 µg SED + 5 µg SEE + AFC	IP ^a
		14	2,5 µg SEA + 2,5 µg SED + 5 µg SEE + AFI	SC ^b
		45	10 µg SEA + 10 µg SED + 10 µg SEE	IV ^c
FA-1.2	2	0	2,5 µg SEA + 2,5 µg SED + 5 µg SEE + AFC	IP
		14	2,5 µg SEA + 2,5 µg SED + 5 µg SEE + AFI	SC
		45	3 µg SEA + 3 µg SED + 3 µg SEE	IS ^d
FB-2	3	0	13,3 µg SEB + AFC	IP
		14	15 µg SEB + 15 µg SEC ₁ + AFI	IP
		44	10 µg SEC ₁	IV
		74	50 µg SEB + 50 µg SEC ₁	IP
FA-3	3	0	25 µg SEA + AFC	IP
		30	100 µg SEA + AFI	IP
		60	75 µg SEA	IV
		90	75 µg SEE	IV
FA-4	3	0	30 µg SEE + AFC	IP
		30	55 µg SEE + AFI	IP
		64	50 µg SEE + AFI	IP
		74	25 µg SEA + 25 µg SEE	IV
FA-5	3	0	10 µg SEA + AFC	IP
		14	25 µg SEA + AFI	IP
		44	50 µg SEA	IV

^aintrapéritonéale ^bsous-cutanée ^cintraveineuse ^dintrasplénique

sodium 1 mM, glutamine 2 mM, gentamycine 0,01%, fongizone 0,05%). La suspension cellulaire a été diluée par un facteur de 10 dans de l'ACK lysine (NH_4Cl 0,15 M, KHCO_3 10 mM, EDTA 0,1 mM) afin de lyser les globules rouges, et encore diluée 1/10 dans du RPMI 1640 (Gibco BRL, Burlington, Ont.). Un comptage cellulaire afin de déterminer la viabilité cellulaire a été fait en présence de bleu de Trypan.

Des cellules myélomateuses P3X653-AG8.653 (ATCC, Rockville, MA) non sécrétrices d'Ig, cultivées en présence de RPMI 1640 enrichi de 10% de sérum foetal bovin (SFB) ont été centrifugées à 7000 rpm pendant 10 minutes. Le culot a été resuspendu dans 5 mL de RPMI 1640 et la viabilité cellulaire déterminée comme décrit précédemment.

Les cellules de rates ont été ajoutées aux cellules myélomateuses dans un rapport de 10:1. Cette suspension a été centrifugée dix minutes à 7000 rpm et resuspendue dans 200 μL de RPMI 1640. Un millilitre de PEG 1000 (polyéthylèneglycol, Sigma, St-Louis, MO) dilué à 50% dans du RPMI 1640 a été ajouté délicatement pendant une minute. Un volume de 3 mL de RPMI 1640 (sans sérum) préchauffé à 37°C a été ensuite ajouté et le mélange agité pendant trois autres minutes. Au cours des trois minutes suivantes, on ajoute un volume de 7 mL du même milieu. Le PEG est ensuite éliminé par une centrifugation de dix minutes à 500 rpm. Les cellules ont été resuspendues dans 5

mL de RPMI 1640 additionné de 10% de SFB avant d'être dénombrées.

Les cellules (5×10^5 cellules / mL) ont été resuspendues dans du RPMI 1640 en présence de 10% de SFB et 1% d'un milieu HAT 100X (hypoxanthine 10 mM, aminoptérine 41 μ M, thymidine 1,6 mM). Cette suspension a été répartie en volumes de 200 μ L par puit. Deux plateaux de 96 puits (Gibco BRL, Burlington, Ont.) ont été utilisés pour les cellules provenant de chaque souris. Les plateaux ont été ensuite incubés dans une étuve humide à 37°C en présence de 7% CO₂. Le pourcentage de croissance cellulaire a été évalué une première fois après 4 jours par observation au microscope, puis aux 48 heures jusqu'au douzième jour. À chaque lecture, 100 μ L de milieu ont été enlevés à chacun des puits pour être remplacés par du milieu frais. À compter du neuvième jour, l'aminoptérine n'a plus été ajoutée au milieu de culture.

1.3 Sélection des hybridomes

La sélection des Ac réagissant le mieux avec les SEs a été réalisée par des techniques de type ELISA.

1.3.1 La technique ELISA directe

Cette méthode est basée sur la propriété des protéines

(Ag) de s'adsorber à des diverses surfaces solides, ainsi que sur la spécificité des réactions Ag-Ac. Les AMC contenus dans les surnageants de culture se lient aux SEs auxquelles ils sont spécifiques. Ces AMC sont détectés par l'ajout d'un antisérum composé de fragments $F(ab')_2$ anti-Ig de souris (Amersham Canada Lté, Oakville, Ont.) couplés à la peroxydase de raifort (HRP) qui sera dorénavant désigné par l'abréviation anti-Ig-souris-HRP. La présence de ce complexe est ensuite détectée par un substrat chromogénique. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la quantité d'AMC liés aux SEs. Le test ELISA direct permet donc de déterminer quels AMC réagissent avec les SEs.

Les étapes de la technique d'ELISA directe sont les suivantes:

- 1- Un volume de 50 μ L de SEs dilués à 3 μ g/mL dans du tampon carbonate de 0,1 M pH 9,6, ont été adsorbés aux fonds des plateaux à 96 puits de type Immulon-2 (Dynatech Laboratories Inc., Fisher Canada, Montréal, Qué.) pendant douze heures à 4°C.
- 2- Lavages des puits (cinq fois) avec un tampon PBS contenant 0,05% de tween-20 (solution de lavage).
- 3- Saturation des puits avec 200 μ L de lait écrémé en poudre dilué à 2% dans du PBS (lait 2%), pendant 30 minutes à 37°C.
- 4- Idem à l'étape 2.

- 5- Ajout des solutions d'Ac à tester (50 μ L/puit), incubation deux heures à 37°C.
- 6- Idem à l'étape 2.
- 7- Ajout de 50 μ L/puit de l'anti-souris-Ig-HRP dilué 1/2000 dans du lait 1%, incubation 2 heures à 37°C.
- 8- Idem à l'étape 2.
- 9- Ajout de 50 μ L/puit du substrat chromogénique TMB (3,3',5,5'-tétraméthyl-benzidine, Kirkegaard et Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD), incubation de 15 minutes à l'obscurité à la température de la pièce.
- 10- Arrêt de la réaction par l'ajout de 50 μ L/puit d'acide phosphorique 0,1 M.
- 11- Lecture des densités optiques à 450nm (Microplate Autoreader, modèle EL309, Bio-Tek Instruments, Mandel Scientific Co. Ltée)

Pour chacun de ces tests, des contrôles positifs, négatifs et des réactifs (blancs) ont été effectués. Pour les blancs, les surnageants des cultures d'hybridomes ont été substitués par du lait 1% (étape 5). Il est nécessaire d'avoir un minimum de trois blancs par Ag utilisé. Un AMC reconnaissant un autre Ag que les SEs a été utilisé comme témoin positif de la réaction ELISA.

1.3.2 La technique ELISA indirecte.

Tout comme le test ELISA direct, la technique ELISA indirecte est basée sur la spécificité des réaction Ag-Ac. Le test ELISA indirect nécessite l'utilisation de deux Ac dirigés contre le même Ag mais provenant d'espèces animales différentes. L'Ag coincé entre ces deux Ac ne subit pas les déformations conformationnelles (pouvant parfois affecter les épitopes) qu'entraîne l'adsorption à une surface solide. Un test ELISA indirect nous indique si l'AMC est capable de reconnaître une SE sous une forme plus naturelle, soit liée à un Ac xénogénique plutôt qu'adsorbée à une surface.

Étapes de la technique ELISA indirecte:

- 1a- Adsorption des sérums de lapin anti-SEs (ou AMC anti-SEs) dilués 1/4000 dans du tampon carbonate 0,1 M pH 9,6 (50 μ L/puit) pendant 12 heures à 4°C.
- 1b- Lavage des puits.
- 1c- Ajout de 50 μ L/puit des SEs diluées à 5 μ g/mL dans du lait 1%, incubation deux heures 37°C.

Les étapes suivantes sont semblables à la technique d'ELISA directe en utilisant les antisérum conjugués au HRP spécifiques soit aux IgG de lapins ou aux IgG de souris.

Lors de l'adsorption, les sérums de lapin anti-SEs ont été

dilués 1/4000, l'AMC D8A8F7-A a été utilisé à 20 µg/mL, l'AMC 2E11H1C7 à 1 µg/mL et les AMC bispécifiques formés à 2 µg/mL. Toutes les dilutions se sont faites dans un tampon carbonate 0,1M pH 9,6.

Un second contrôle négatif, contenant toutes les réactifs à l'exception des SEs, a été inclus de routine pour chacun de ces tests.

1.3.3 Entreposage des clones sélectionnés

Lorsqu'un surnageant a été considéré positif, une partie des hybridomes parentaux a été congelée, alors que l'autre partie a été clonée par dilution limite sur un plateau de 96 puits de façon à n'avoir qu'une cellule par puit. Quelques hybridomes ont été clonés une seconde fois pour s'assurer de la monoclonalité des Ac sécrétés. Après chaque clonage, de nouveaux tests ELISA ont été réalisés afin de sélectionner les clones sécrétant les AMC ayant la spécificité désirée.

1.4 Production de liquide d'ascite

Des liquides d'ascite ont été induits pour chaque AMC sélectionné afin de les produire en grande quantité. Des souris femelles BALB/c de 18 à 20 g ont reçu une injection de 0,5 mL de pristane (2,6,10,14-tétraméthylpentadécane, Aldrich

Chemical Company, Milwaukee, WI) intrapéritonéalement (jour 0), suivie d'une autre injection identique sept jours plus tard. Au jour 10, ces mêmes souris ont été injectées intrapéritonéalement avec 2×10^6 hybridomes contenus dans 0,5 mL de RPMI 1640 stérile. Les prélèvements des liquides d'ascites ont eu lieu entre les jours 7 et 21 après l'injection des hybridomes selon le degré de distension des abdomens, par ponction de la cavité abdominale avec des aiguilles hypodermiques.

1.5 Purification des anticorps monoclonaux

Les liquides d'ascites obtenus ont été centrifugés 15 minutes à 7000 rpm. Les AMC contenus dans les surnageants ont été précipités en ajoutant goutte à goutte sous agitation constante un volume égal d'une solution de sulfate d'ammonium saturée. Les AMC précipités ont été redissous dans de l'eau distillée et ensuite dialysés contre du tampon de couplage (Pierce, Rockford, IL) pendant 48 heures dans un ratio d'un volume d'AMC pour 50 volumes du tampon de couplage.

La purification des AMC a été réalisée en utilisant la technique d'immunoaffinité sur colonne de d'agarose-SPA de type Hi-Trap (Pharmacia Canada, Baie d'Urfé, Qué.). Chaque colonne de 5 mL a été équilibrée avec le tampon de couplage avant d'y faire circuler, en circuit fermé une solution d'AMC pendant une heure. La colonne a été lavée avec le tampon de couplage

jusqu'à ce que l' A_{280} (absorbance à 280 nm) soit inférieure à 0,1. Les AMC retenus au gel de SPA ont été ensuite élués avec le tampon d'éluion (Pierce, Rockford, IL).

1.6 Concentration et lyophilisation des Ac purifiés

Les AMC purifiés ont été concentrés par ultrafiltration sur système Amicon (Amicon, Beverly, MA) en utilisant une membrane PM-10. Les concentrations des solutions d'AMC ont été estimées selon leur absorbance spécifique à 280 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$, 280 nm = 14). Ceux-ci ont été par la suite dialysés contre du bicarbonate d'ammonium 0,1 M avant d'être lyophilisés et entreposés à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

1.7 Caractérisation des Ac monoclonaux

1.7.1 Détermination des classes et sous-classes ainsi que les chaînes légères des immunoglobulines

Les classes et sous-classes ainsi que les chaînes légères des immunoglobulines présentes dans les surnageants de culture des hybridomes, ont été déterminées par une technique d'immuno-dot, en utilisant une trousse commerciale de la compagnie Amersham (Oakville, Ont.) en suivant le protocole suggéré.

1.7.2 Technique d'ELISA compétitif

La technique d'ELISA compétitif sert à vérifier la réactivité réelle des AMC avec les SEs sous leurs conformations naturelles en milieu aqueux. Chaque Ac a été mis en présence de différentes concentrations de chacune des SEs en phase liquide pendant deux heures à 37°C avant d'être testé par la méthode d'ELISA directe. Chaque échantillon a été testé en triplicata. Le tableau V indique les proportions des mélanges Ac-SEs effectuées pour les études d'inhibition de la réaction.

1.7.3 Isoélectrofocalisation

La détermination du point isoélectrique de chaque Ac monoclonal a été réalisée par l'utilisation d'un appareil de type Phast System (Pharmacia). L'isoélectrofocalisation (gel IEF 3-9) a été réalisée en suivant le protocole suggéré par le manufacturier.

1.8 Élimination de la réaction croisée entre la SPA et les anticorps

1.8.1 Préparation des fragments $F(ab')_2$

Afin d'éviter les réactions croisées possibles entre les AMC et la SPA parfois présente dans des extraits alimentaires,

TABLEAU V **Préparation des échantillons d'entérotoxines en**
compétition pour un même AMC

[SE] _{final} ($\mu\text{g/mL}$)	[SE] _{départ} ($\mu\text{g/mL}$)	SE (μL)	LAIT 1% (μL)	AMC* (μL)	VOL _{total} (μL)
c ⁺	0	0	300	1500	1800
10	100	30	20	250	300
1	10	30	20	250	300
0,1	10	3	47	250	300
0,01	1	3	47	250	300

* La dilution des AMC utilisée doit être préalablement déterminée afin d'obtenir une A_{450} d'environ 1,0 lors d'un test ELISA direct.

les AMC ont été hydrolysés avec de la pepsine. Cette digestion enzymatique coupe et dégrade les portions Fc des Ac. Pour l'obtention des fragments $F(ab')_2$, une trousse fournie par la compagnie Pierce (Rockford, IL) a été utilisée en suivant les instructions suggérées par le manufacturier.

1.8.2 Traitement des échantillon avec un sérum de lapin

La SPA possiblement présente dans les échantillon peut aussi être éliminée par une préincubation en présence de 10% d'IgG de lapins pendant 30 minutes à 37°C, suivi d'une centrifugation (10 minutes 5000 rpm) afin d'éliminer les complexes formés, tel qu'utilisé par KUFFNER et al. (1988).

2. CONSTRUCTION D'ANTICORPS BISPÉCIFIQUES

Un minimum de 5 mg de chacun des Ac est requis pour obtenir un rendement acceptable. Des Ac bispécifiques ont été produits à partir d'Ac polyclonaux de lapins anti-SEs. Les sérums d'Ac polyclonaux proviennent de lapins injectés avec des peptides synthétiques pSEA(225-233) et pSEB(13-25) (NAUM, 1991). Des AMC bispécifiques ont été construits en utilisant les AMC purifiés D8A8F7 et 2E11H1C7.

- 1- Les Ac purifiés lyophilisés ont été resuspendus dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM à

pH 7,2 et dialysés 48 heures contre ce même tampon phosphate.

- 2- Les concentrations des solutions contenant des Ac ont été déterminées par l'absorbance à 280 nm.
- 3- L'introduction de groupements 2-pyridyl disulphyde sur les Ac a été faite en utilisant une solution de 20 mM de SPDP (Pierce, Rockford, IL) diluée avec de l'éthanol 100%. Une concentration molaire de SPDP cinq fois supérieure à la solution d'AMC a été ajoutée en agitation douce, à la température de la pièce, pendant une heure.
- 4- L'excès de réactifs a été éliminé par un passage sur une colonne PD-10 de Sephadex G-25 (Pharmacia, Baie d'Urfée, Qué.). La colonne PD-10 ayant servi pour l'Ac «A» a été préalablement équilibrée avec le tampon phosphate pH 7,2, alors que la colonne utilisée pour l'Ac «B» a été équilibrée avec un tampon acétate de sodium 0,1 M, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 4,5. Les éluats ont été recueillis en fractions de 1 mL; les fractions les plus concentrées ont été mises en commun.
- 5- Pour chaque Ac un échantillon dilué a été mis de côté pour déterminer le nombre moyen de molécules de SPDP fixées sur chaque AMC. Ceci a été fait en ajoutant 1/20 du volume de DTT (Sigma, St-Louis, Mo, USA) 100 mM dilué dans le tampon acétate. Ceci a pour effet de libérer les molécules de pyridine-2-thione ayant un coefficient d'extinction de $8080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 343 nm (STUCHBURY et al.,

1975), donc de permettre l'évaluation du nombre de molécules de SPDP s'étant fixées.

- 6- Le volume de la solution d'Ac «B» a été concentré sur Centricon-100 (Amicon) jusqu'à un volume de 2 mL. Des groupements thiols ont été obtenus en faisant réagir les Ac avec du DTT à une concentration finale de 5 mM pendant une heure à l'obscurité en absence d'air. Cette réaction de réduction amène la libération de pyridine-2-thione sans affecter les Ac.
- 7- Les Ac «B» ayant des groupements thiols ont été séparés des molécules de faible PM par une filtration moléculaire sur colonne de Sephadex G-25 de 1,5 X 50 cm préalablement équilibrée avec le tampon phosphate pH 7,2. Parmi les tubes de 1 mL recueillis, ceux ayant les plus fortes concentrations protéiques ont été mises en commun.
- 8- Les Ac «B» ayant des groupements thiols libres ont été mélangés de façon équimolaire avec les Ac «A» possédant des groupements 2-pyridyl disulphyde. La réaction de couplage des deux Ac se mesure en suivant la cinétique de la libération de pyridine-2-thione par son absorbance à 343 nm.
- 9- Le mélange final préalablement concentré sur Centricon-100 jusqu'à un volume de 2,5 mL a été ensuite analysé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Waters, Millipore) en utilisant une colonne HR-16 (Pharmacia) remplie de Superose-6 (Pharmacia) préalable-

ment équilibrée avec le tampon phosphate. Le débit a été réglé à 0,25 mL/min et des fractions de 1 mL ont été recueillies.

- 10- La vérification de la bispécificité des Ac obtenus a été effectuée par des tests ELISA directs et indirects.

Deux colonnes de type Protein Pak 300sw 0,75 X 30 cm (millipore) montées en séries ont été utilisées comme alternative à la colonne de Superose-6 pour l'analyse des Ac bispécifiques construits à partir d'Ac polyclonaux de lapins.

RÉSULTATS

1. IMMUNISATION DES SOURIS

Cinq groupes de souris ont été immunisés en utilisant différents mélanges de SEs. Parmi le groupe FA-1 (tableau IV), deux des quatre souris reçurent une dose de rappel par voie intrasplénique tel que décrit par LAPEYRE et al. (1987) qui leur a été fatale. Toutes les autres souris, à l'exception d'une du groupe FA-3, ont survécu aux doses d'immunisation. Avant chaque fusion cellulaire les titres des sérums anti-SEs de toutes les souris ont été déterminés par ELISA. Seuls les animaux ayant un titre élevé (supérieur à 1/5000) ont été utilisés pour les fusions cellulaires.

1.1 Fusions cellulaires

Les rendements pour l'obtention d'hybridomes ont été très variables d'une fusion à l'autre. La fusion issue de l'immunisation de souris avec SEB et SEC₁ a eu un excellent rendement avec plus de 200 hybridomes formés. Par contre les fusions issues de souris immunisées avec les SEA, SED et SEE, ont eu des rendements faibles. Les fusions FA-1 et FA-4 n'ont produit aucun hybridome. La fusion FA-3 en a produit 20, et la fusion FA-5 en a produit 18.

2. SÉLECTION DES HYBRIDOMES

Les surnageants de culture produits par les hybridomes ont été testés afin de déterminer s'ils contenaient des Ac réagissant avec les SEs.

2.1 Test ELISA direct

Les surnageants testés par ELISA direct contre les SEs ont permis de constater qu'aucun des 20 hybridomes obtenus lors de la fusion FA-3 ne sécrétait d'Ac réagissant de façon significative avec les SEs utilisées lors de l'immunisation. Le maintien de ces hybridomes a alors été abandonné.

Parmi les 18 hybridomes obtenus lors de la fusion FA-5, sept ont réagi significativement (réaction deux fois supérieure aux contrôles des réactifs) avec une ou plusieurs SEs utilisées lors de l'immunisation (SEA, SED et SEE). Ces hybridomes ont été clonés par dilution limite afin de s'assurer de la monoclonalité des Ac sécrétés. Les surnageants de culture des clones obtenus ont été revérifiés par des tests ELISA directs. Il s'est avéré que les clones issus de quatre des sept hybridomes de départ (C5, E9, F5, F9) ne sécrétaient plus d'Ac spécifiques aux SEs. Par contre, les clones issus des trois autres (A8, C10, D8) ont produit des AMC réagissant toujours contre une ou plusieurs SEs. Un second clonage a été effectué pour les

clones montrant une réaction avec plus d'une SE. De nouveaux tests ELISA directs ont révélé que le clone D8A8F7 sécrétait des AMC réagissant avec SEA, SED et SEE. Les résultats des tests ELISA directs effectués sur les AMC les plus intéressants issus de cette fusion sont montrés dans le tableau VI.

Tous les hybridomes obtenus lors de la fusion FB-2 ont aussi été testés en ELISA direct pour évaluer la réaction de leurs Ac envers SEB et SEC₁. Une grande partie des hybridomes obtenus ont réagi positivement avec au moins l'une des deux SEs. Parmi ceux-ci, 41 ont réagi de façon significative à la fois avec SEB et SEC₁. Un clonage a été effectué pour sept d'entre eux. Les Ac produits par les clones réagissaient toujours contre au moins l'une des deux SEs. Un second clonage a été réalisé avec quatre de ces clones (1H3H8, 1H8F3, 2C9G5 et 2E11H1). Le clone 2E11H1C7 a produit les AMC ayant les plus fortes réactions à la fois contre SEB et contre SEC₁. Les résultats des tests ELISA directs des AMC issus de cette fusion sont montrés dans le tableau VII.

2.2 Caractérisation des Ac monoclonaux

Il est important de connaître à quelles classes et sous-

TABEAU VI Sélection des AMC secrétés par les hybridomes de la fusion FA-5

CLONE	SEA	SEB	SEC ₁	SED	SEE
A8	-	-	-	+	++
A8D11	-	-	-	++	-
A8D11E7	-	-	-	+++	++
A8D12	-	-	-	++	-
A8D12C6	-	-	-	+	+
A8E11	-	-	-	++	-
A8E11D2	-	-	-	+	+
C10	-	-	-	+	+++
C10B5	-	-	-	++	-
C10B5G9	-	-	-	++	+
C10D10	-	-	-	++	-
C10D10E2	-	-	-	+	+
D8	+++	-	-	+	+
D8A8	+++	-	-	++	++
D8A8B4	+	-	-	++	+
D8A8F7	++	-	-	+++	+++
D8G3	+	-	-	-	++
D8G3G3	+	-	-	+++	+
D8G8	++	-	-	-	++
D8G8B9	++	-	-	+	+
C5	-	-	-	-	+
E9	+	-	-	-	+
F5	-	-	-	-	+++
F9	+	-	-	++	++

- : négatif ++ : $0,5 < A_{450} < 1,0$
+ : $A_{450} < 0,5$ +++ : $1,0 < A_{450}$

TABLEAU VII sélection des AMC sécrétés par les hybridomes de la fusion FB-2

CLONE	SEA	SEB	SEC ₁	SED	SEE
1H3	-	++	+	-	-
1H3H8	-	-	++++	-	-
1H3H8B4	-	-	++++	-	-
1H8	-	++++	++	-	-
1H8F3	-	++++	-	-	-
1H8F3C7	-	++++	-	-	-
2C2	-	+++	++	-	-
2C2F4	-	++++	-	-	-
2C9	-	++++	+	-	-
2C9G5	-	+++	+	-	-
2C9G5B9	-	+++	+++	-	-
2C10	-	++++	+++	-	-
2C10B9	-	++	-	-	-
2E11	-	++++	+++	-	-
2E11H1	-	++++	+++	-	-
2E11H1C7	-	++++	+++	-	-
2H5	-	+++	+++	-	-
2H5C4	-	++	++++	-	-

- : négatif
 + : $A_{450} < 0,5$
 ++ : $0,5 < A_{450} < 1,0$

+++ : $1,0 < A_{450} < 2,0$
 ++++ : $2,0 < A_{450}$

classes d'Ig les AMC appartiennent afin de déterminer les propriétés qui leurs sont propres. Les AMC sélectionnés doivent posséder les caractéristiques nécessaires à leur utilisation future. Dans notre cas, ils seront utilisés comme réactif de dépistage des SEs. Les principales propriétés requises sont donc celles qui permettent une purification à haut rendement. Seules les sous-classes IgG₁ et IgG_{2a} de souris répondent à ces critères. Il est important que la caractérisation des AMC se fasse à partir de surnageant de culture et non de liquide d'ascite. Ce dernier peut contenir en plus des AMC, d'autres Ig provenant de l'animal et ainsi rendre la caractérisation plus difficile. Il a été établi que les AMC sélectionnés, notamment D8A8F7 et 2E11H1C7 étaient tous deux des IgG₁ possédant chacun des chaînes légères de type κ.

2.3 Obtention des liquides d'ascite

Les hybridomes sécréteurs d'AMC D8A8F7-A ont été injectés intrapéritonéalement à 10 souris. Aucun liquide d'ascite n'a alors été produit, les hybridomes ayant plutôt induit la formation de tumeurs solides. Une nouvelle tentative a été effectuée pour obtenir le même résultat. À la troisième reprise, 20 souris d'un nouveau lot ont été injectées de la même manière avec les hybridomes D8A8F7-A. Cette fois, 80 mL de liquide d'ascite ont été recueillis. Le passage de ce liquide d'ascite sur une colonne de SPA nous a permis d'obtenir 102 mg d'AMC

purifiés (fig.4).

De la même manière, les hybridomes sécréteurs de l'AMC 2E11H1C7 ont été injectés à 15 souris. De celles-ci 70 mL de liquide d'ascite ont été obtenus sans complications. La purification des AMC par chromatographie d'affinité sur colonne d'agarose-SPA a permis l'obtention de 110 mg de l'AMC 2E11H1C7 (fig.5).

Les AMC D8A8F7 et 2E11H1C7 purifiés ont été lyophilisés et entreposés à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

2.4 Analyse de la réaction des anticorps monoclonaux purifiés avec les entérotoxines

Afin de bien caractériser les réactions entre les AMC purifiés et chacune des SEs, quatre types de tests ELISA différents ont été utilisés. Les résultats présentés ici ont été répétés un minimum de quatre fois. Les coefficients de variation obtenus lors des tests ELISA ont varié de 10 à 12%.

Les tests ELISA directs ayant préalablement servi à la sélection des hybridomes ont été repris avec les AMC purifiés du liquide d'ascite. Ce type de test nous renseigne sur la capacité des AMC de réagir avec des SEs adhérees à une surface solide. Il est possible que les SEs subissent des déformations

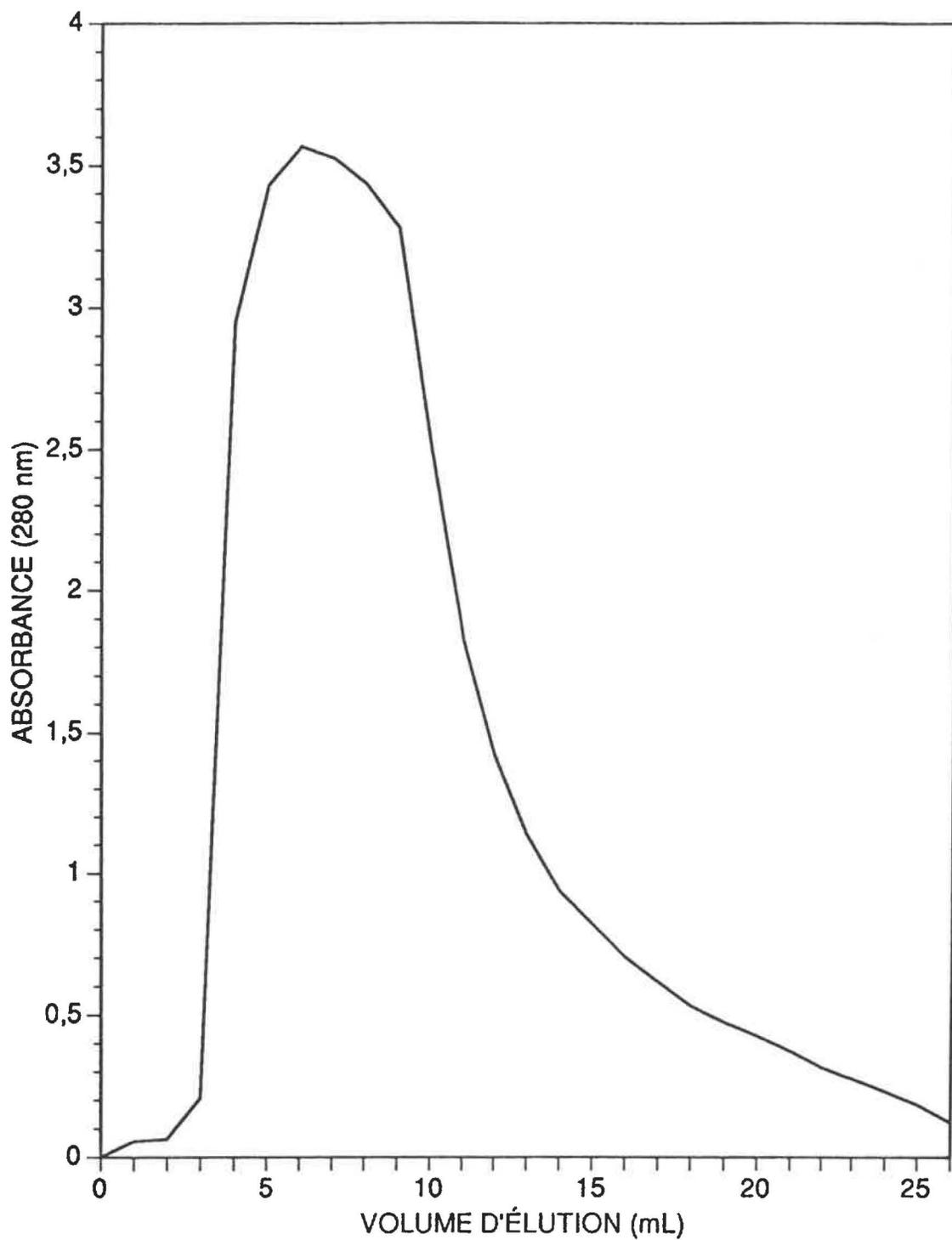


Fig. 4 Profil d'élution de l'AMC D8A8F7-A sur une colonne d'agarose-SPA

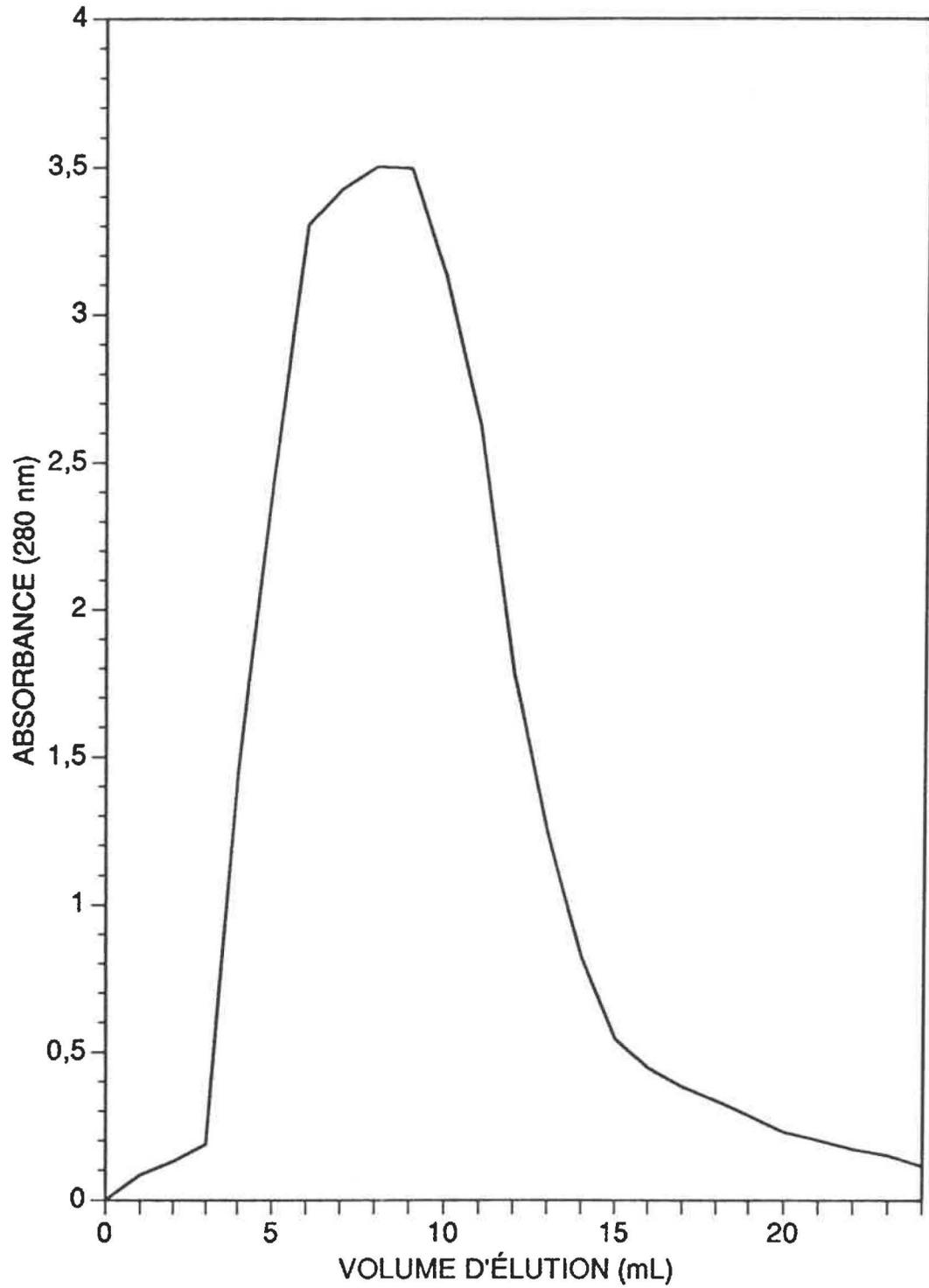


Fig.5 Profil d'éluion de l'AMC 2E11H1C7 sur une colonne d'agarose-SPA

conformationnelles après s'être fixées au polystyrène et qu'elles exposent des épitopes déformés. Les AMC 2E11H1C7 provenant du liquide d'ascite ont réagi de la même façon que les AMC contenus dans les surnageants de culture, soit fortement avec SEC₁ et très fortement avec SEB (fig.6). Alors que le surnageant de culture de l'hybridome D8A8F7 réagissait avec SEA, SED et SEE, les AMC issus de l'ascite correspondant ne réagissaient qu'avec SEA (fig.7).

Les tests ELISA indirects où les SEs sont liées à des Ac de lapin anti-SEs adhérents au polystyrène indiquent la capacité des AMC de réagir avec les SEs dans un état semblable à leur conformation naturelle. L'AMC 2E11H1C7 s'est révélé réagir toujours aussi fortement avec SEB et SEC₁. Aucune réaction n'a été observée avec les autres SEs (fig.8). L'AMC D8A8F7 n'a eu qu'une faible réaction avec SEA sans réagir avec d'autres SEs (fig.9), alors que les AMC des surnageants réagissaient avec la SED et la SEE.

Les tests ELISA de type compétitif nous renseignent sur l'affinité des AMC envers les SEs en phase liquide, soit dans leur état le plus naturel. Les tests ELISA compétitifs ont été réalisés avec les AMC purifiés des liquides d'ascite seulement. La réaction de l'AMC 2E11H1C7 avec SEB en ELISA direct a été abolie à 100% par l'ajout de 10 µg/mL de SEB à la solution d'AMC. L'addition de SEC₁ à la même concentration n'a inhibé

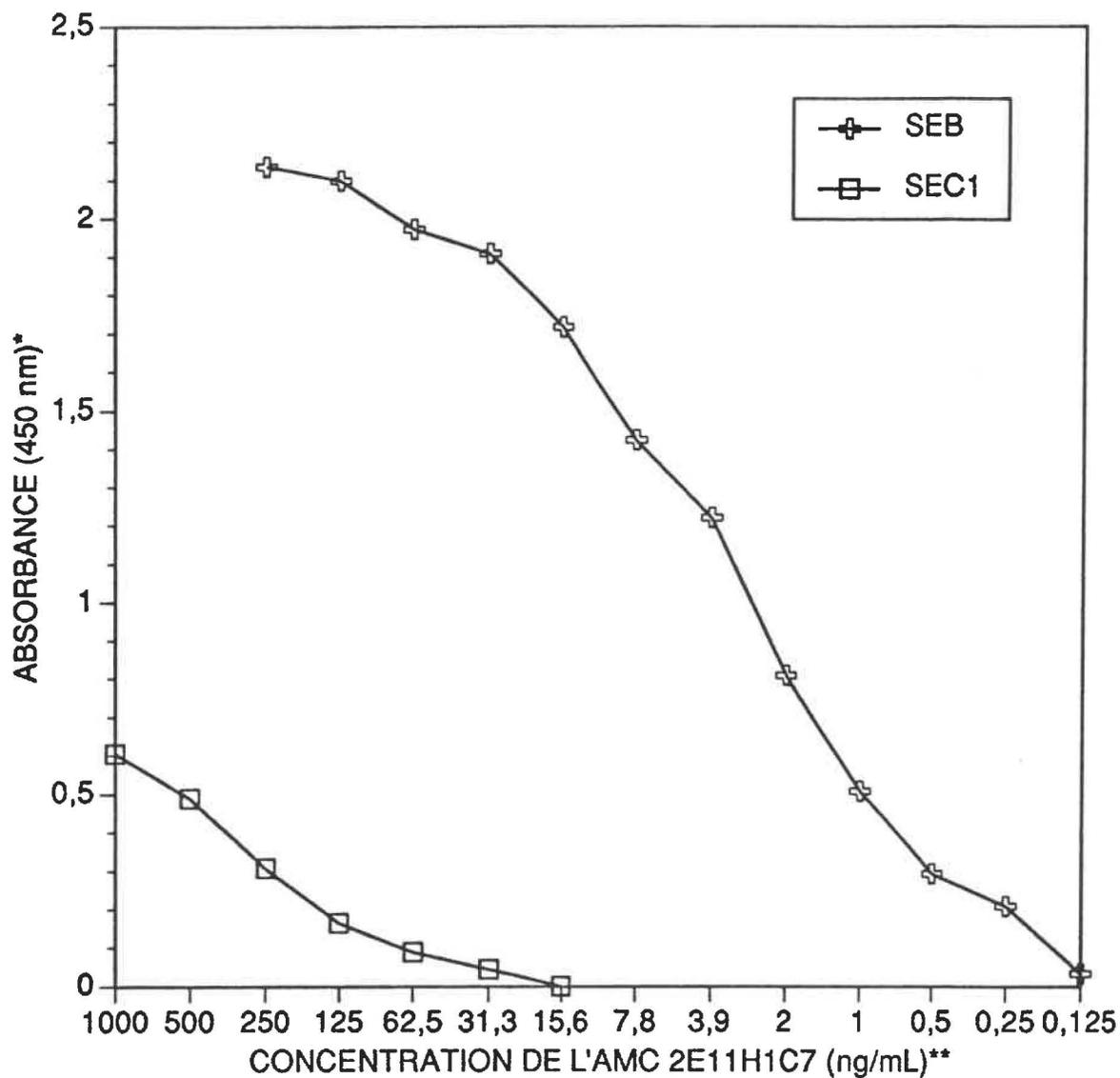


Fig.6 Titrage de l'AMC 2E11H1C7 par le test ELISA direct

* La valeur moyenne des contrôles négatifs a été soustraite de chacune des valeurs indiquées.

** Les SEA, SED et SEE n'ayant pas réagi, leurs courbes ne sont pas illustrées.

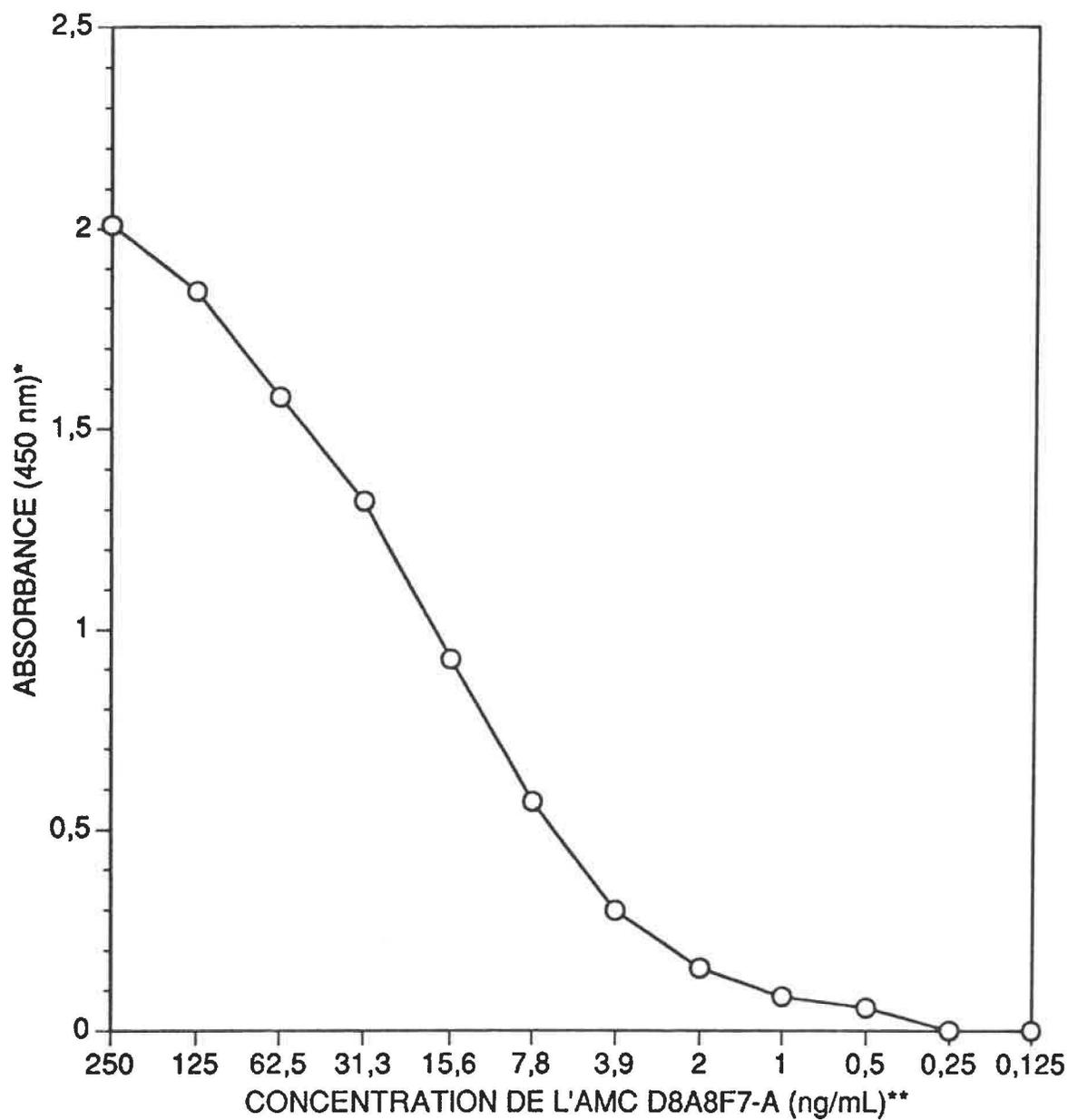
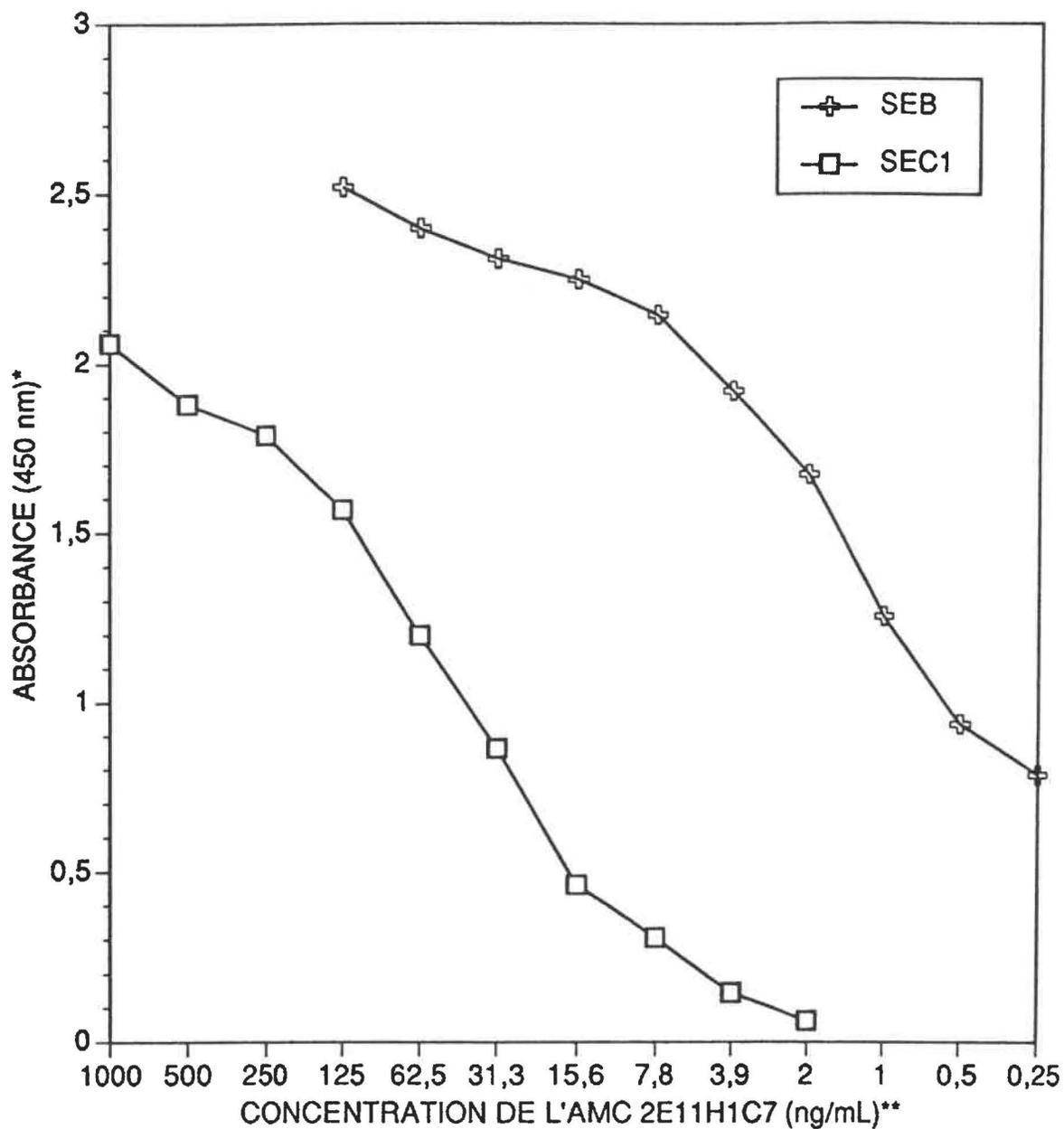


Fig. 7 Titrage de l'AMC D8A8F7-A par le test ELISA direct

* La valeur moyenne des contrôles négatifs a été soustraite de chacune des valeurs indiquées.

** Seule la courbe de la SEA est illustrée, les autres SEs n'ayant pas réagi.



F ig. 8 Titrage de l'AMC 2E11H1C7 par le test ELISA indirect

* La valeur moyenne des contrôles négatifs a été soustraite de chacune des valeurs indiquées.

** Les SEA, SED et SEE n'ayant pas réagi, leurs courbes ne sont pas illustrées.

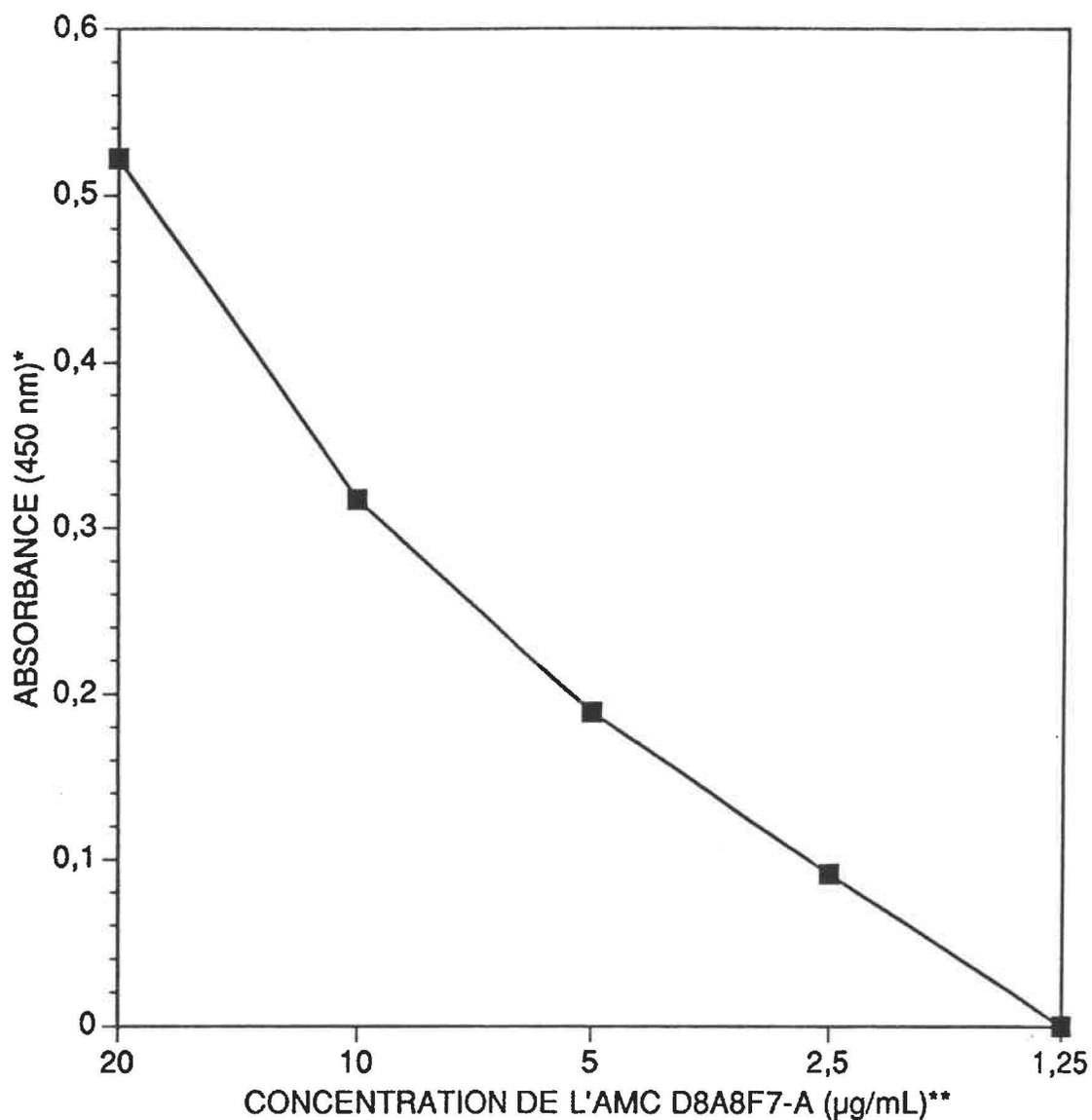


Fig.9 Titrage de l'AMC D8A8F7-A par le test ELISA indirect

- * La valeur moyenne des contrôles négatifs a été soustraite de chacune des valeurs indiquées.
- ** Seule la courbe de la SEA est illustrée, les autres SEs n'ayant pas réagi.

la réaction qu'à 30%. Les autres SEs n'ont donné aucune inhibition significative (fig.10). La réaction entre l'AMC D8A8F7 et la SEA en ELISA compétitif a été diminuée de 59% par l'ajout de 10 µg/mL de SEA et n'a pas été affectée par l'ajout d'autres SEs (fig.11).

Les ELISA indirects, où les AMC sont utilisés comme premiers Ac, ont servi à la détection des SEs. Ces tests n'ont pu être effectués qu'avec les AMC purifiés. L'AMC 2E11H1C7 (1/500 000) a pu détecter jusqu'à 1 ng/mL de SEB et 30 ng/mL de SEC₁ (fig.12).

De son côté, l'AMC D8A8F7 a eu des réactions croisées avec l'anti-Ig-lapin-HRP rendant impossible l'interprétation des résultats obtenus. Ce problème a été résolu en ajoutant l'AMC D8A8F7 à la solution d'Ac anti-IgG de lapin-HRP, les complexes formés ont été éliminés par une centrifugation. Cette étape s'est faite avant l'ajout de l'Ac anti-lapin-HRP au test ELISA. Cette même étape a été aussi utilisée lors des tests effectués avec les AMC bispécifiques contenant eux aussi l'AMC D8A8F7. Après ce traitement l'AMC D8A8F7 (1/50 000) n'a pu détecter que 500 ng/mL de SEA (fig.13).

Les points isoélectriques déterminés pour les AMC 2E11H1C7 et D8A8F7 purifiés ont été respectivement de 6,7 et 9,2. Le tableau VIII montre un résumé des principales caractéristiques

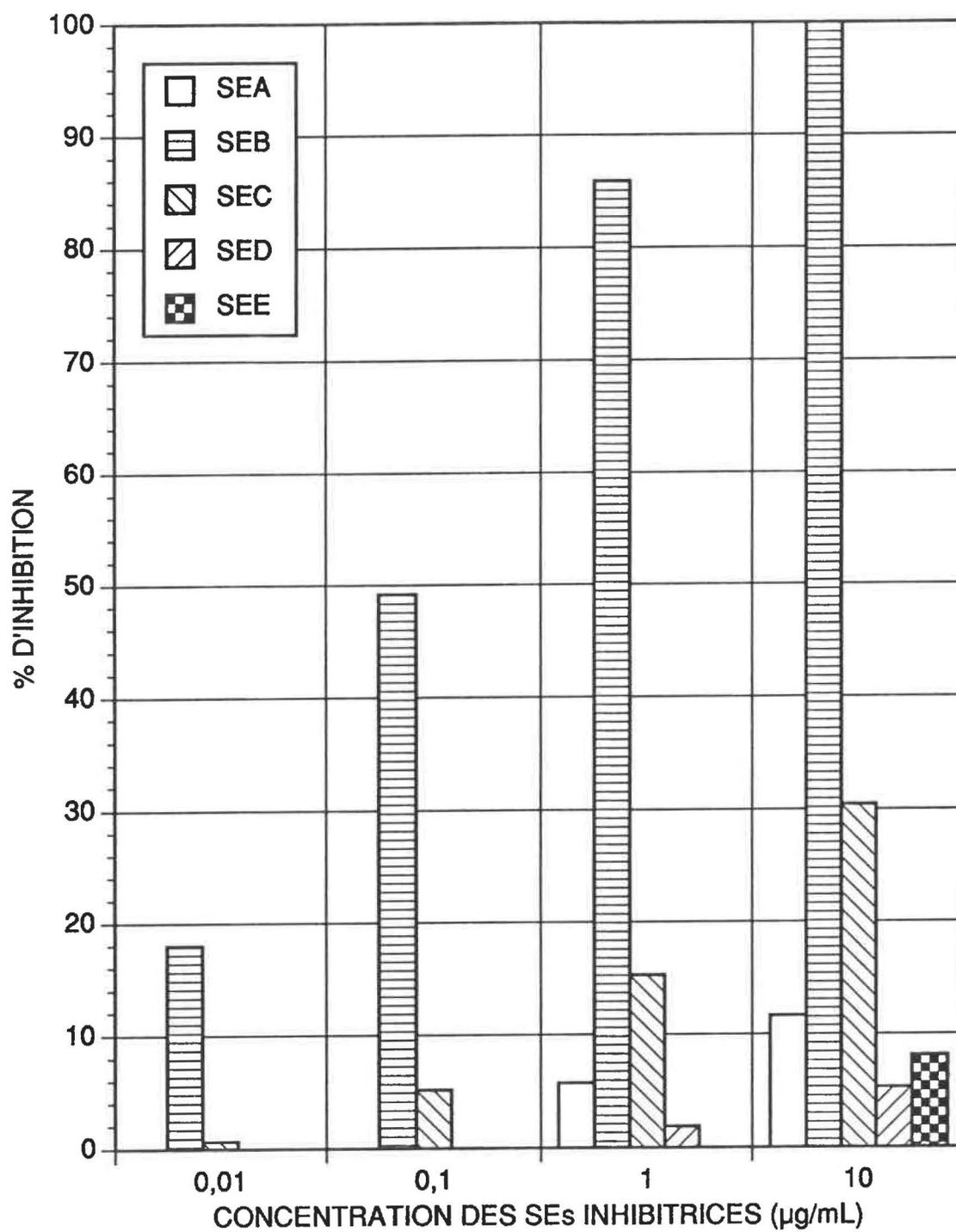


Fig. 10 Inhibition de la réaction de l'AMC 2E11H1C7 avec SEB par des concentrations croissantes des diverses SEs.

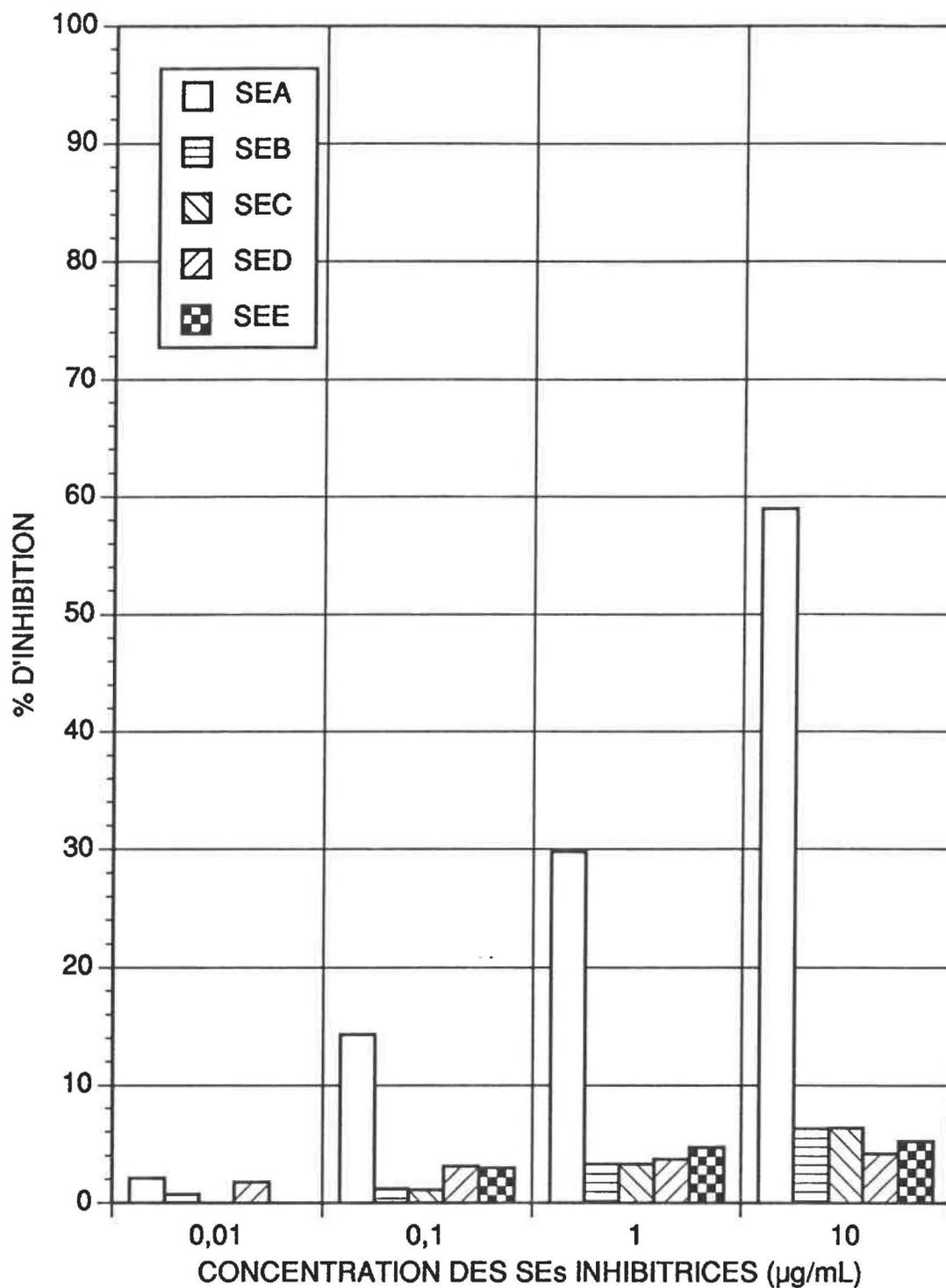


Fig. 11 Inhibition de la réaction de l'AMC D8A8F7-A avec SEA par des concentrations croissantes des diverses SEs.

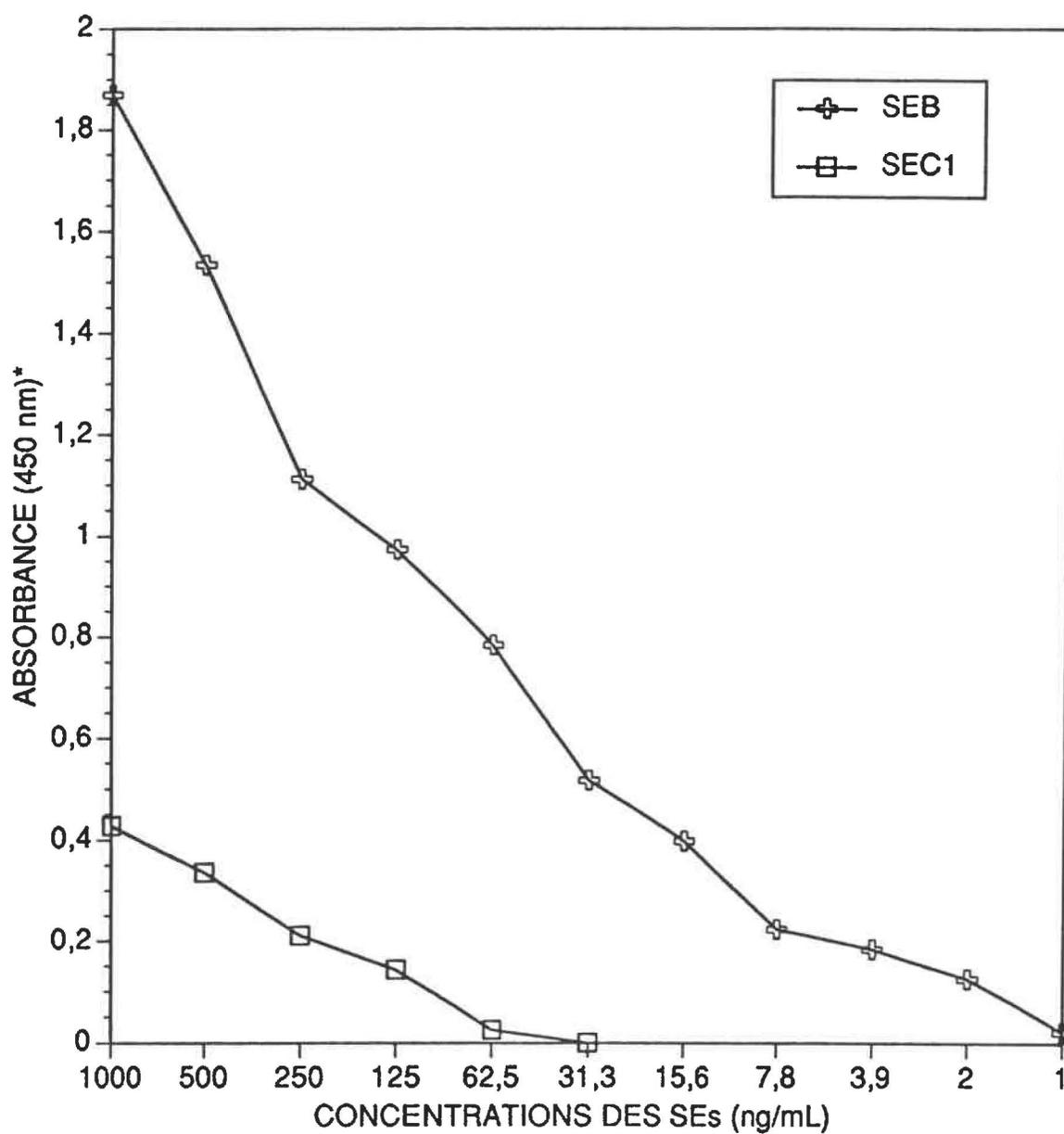


Fig.12 Détection des SEB et SEC1 par l'AMC 2E11H1C7 par un test ELISA indirect

* La valeur moyenne des contrôles négatifs a été soustraite de chacune des valeurs indiquées.

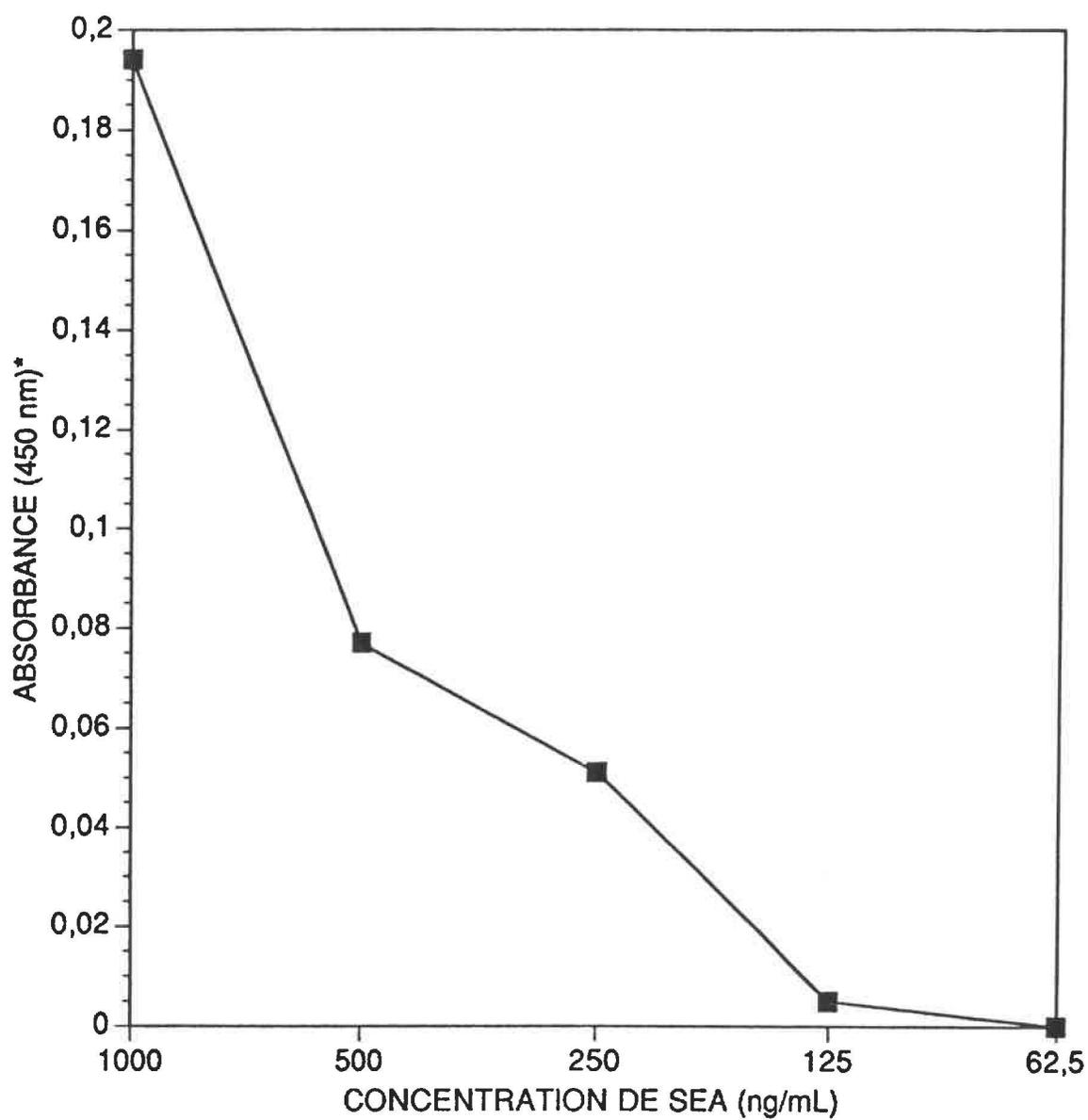


Fig.13 Détection de la SEA par l'AMC D8A8F7-A par un test ELISA indirect

* La valeur moyenne des contrôles négatifs a été soustraite de chacune des valeurs indiquées.

TABLEAU VIII Caractérisation des AMC sélectionnés

CARACTÉRISTIQUES		D8A8F7 ^a	D8A8F7-A ^b	2E11H1C7
POINT ISOÉLECTRIQUE		ND	9,2	6,7
ISOTYPE		IgG ₁ κ	IgG ₁ κ	IgG ₁ κ
ELISA DIRECT	SEA	+	++++	-
	SEB	-	-	++++
	SEC	-	-	+++
	SED	++++	-	-
	SEE	++	-	-
ELISA INDIRECT	SEA	-	+	-
	SEB	-	-	++++
	SEC	-	-	++++
	SED	++++	-	-
	SEE	+	-	-
ELISA COMPÉTITIF	SEA	ND	++	-
	SEB	ND	-	++++
	SEC	ND	-	++
	SED	ND	-	-
	SEE	ND	-	-
DÉTECTION ENTÉROTOXINES	SEA	ND	+	-
	SEB	ND	-	++++
	SEC ₁	ND	-	++
	SED	ND	-	-
	SEE	ND	-	-

^a AMC contenus dans les surnageants de cultures d'hybridomes

^b AMC purifié à partir de liquide d'ascite

ND: non déterminé

des Ac monoclonaux sélectionnés.

Afin d'éviter les réactions croisées entre les fragments Fc des AMC sélectionnés et la SPA possiblement présente dans certains extraits alimentaires, l'AMC D8A8F7-A a été digéré avec de la pepsine. Le passage du mélange résultant de cette digestion sur une colonne de SPA a permis de séparer les fragments $F(ab')_2$ des IgG non digérés. Les échantillons contenant les fragments $F(ab')_2$ ainsi que les fragments Fc trop dégradés n'étant pas retenus par la colonne de SPA ont été mis en commun et analysés sur une colonne de Superose-6 montée sur un HPLC, à un débit de 0,5 mL/min. Le résultat de cette analyse est montré à la figure 14. Les protéines retenues sur la colonne de SPA ont été éluées et analysées sur la même colonne de Superose-6 (fig. 15). La figure 15 montre un pic principal à 120,8 minutes correspondant aux Ac non digérés, les pics mineurs à 182,6 et 195,1 minutes correspondent aux fragments Fc s'étant liés à la SPA. Les fragments $F(ab')_2$ avaient leur profil d'éluion retardé de 3,6 minutes comparé aux IgG entiers (fig.14 et 15). Le pic à 124,4 minutes correspond aux fragments $F(ab')_2$, la série de pics suivants représentent les fragments Fc plus ou moins dégradés lors de la digestion. Vue la grande proportion de ces fragments en comparaison des fragments $F(ab')_2$, ce mélange a été concentré par ultrafiltration sur Centricon-30 dans le but d'éliminer les peptides de faibles poids moléculaires. Le résultat de cette concentration

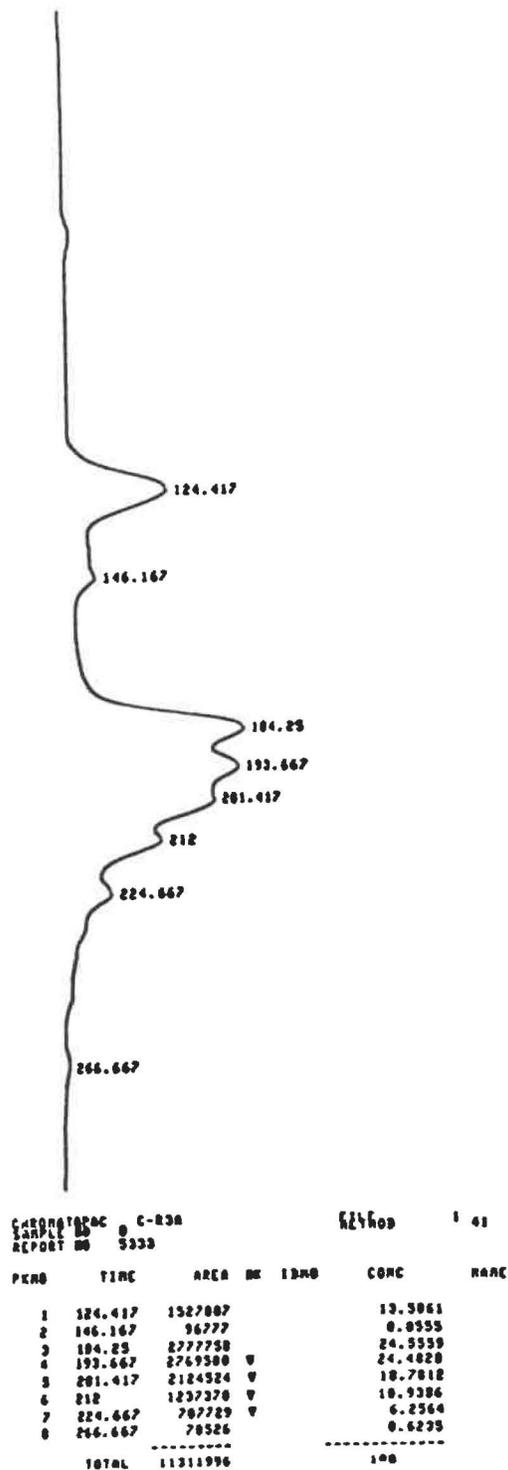


Fig.14 Analyse sur une colonne de Superose-6 des fragments $F(ab')_2$ obtenus par la digestion de l'AMC D8A8F7-A avec la pepsine

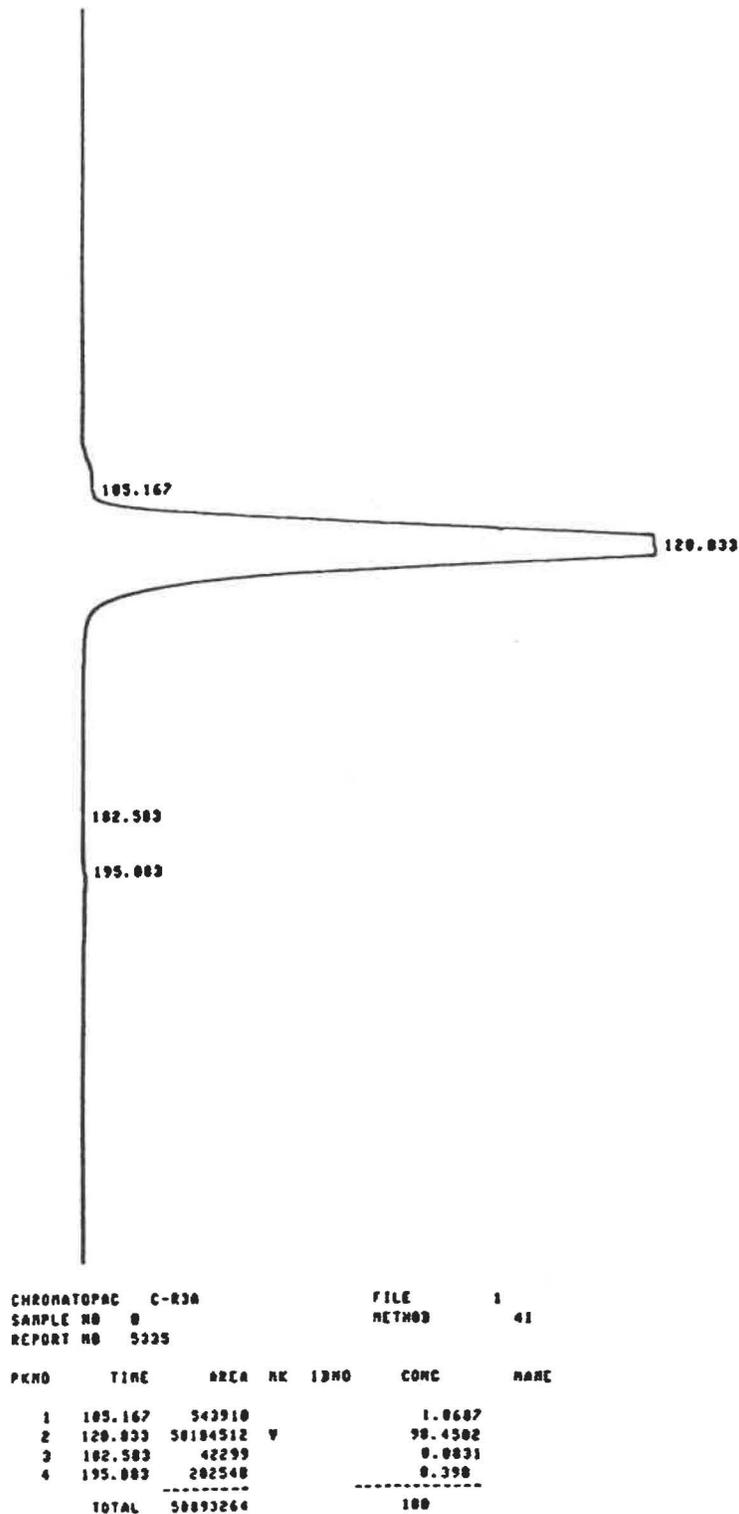


Figure 15

Analyse des IgG non dégradés lors de la digestion de l'AMC D8A8F7-A par la pepsine, sur une colonne de Superose-6

a été analysé de la même manière que les deux précédents (fig.16). Cette étape a permis d'augmenter la proportion de $F(ab')_2$ présent dans le mélange de 13,5% à 38,8%. Le mélange final obtenu contenait seulement 0,8 mg de protéines, alors que 17 mg d'Ac avaient été utilisés initialement ce qui correspond à près de 95% de pertes.

3. LES ANTICORPS BISPÉCIFIQUES

3.1 Calibration de la colonne de Superose-6

Un mélange de molécules de divers poids moléculaires a servi à calibrer la colonne de Superose-6. Le profil d'élution (fig.17) montre la présence de cinq pics qui correspondent dans l'ordre aux Bleu Dextran (2000 kDa), thyroglobuline (669 kDa), ferritine (440 kDa), IgG humains (150 kDa) et à l'albumine de sérum bovin (67 kDa).

3.2 Couplage de deux anticorps de lapin anti-SE

Les Ac provenant d'un antisérum de lapins immunisés avec le peptide synthétique pSEA(225-233), ont été purifiés sur une colonne d'agarose-SPA. Ces Ac réagissaient avec SEA, SED et SEE lors de tests ELISA directs ou indirects. D'autres Ac de lapins, réagissant avec SEB et SEC_1 , obtenus par l'immunisation avec le peptide pSEB(13-25), ont été purifiés de la même façon.

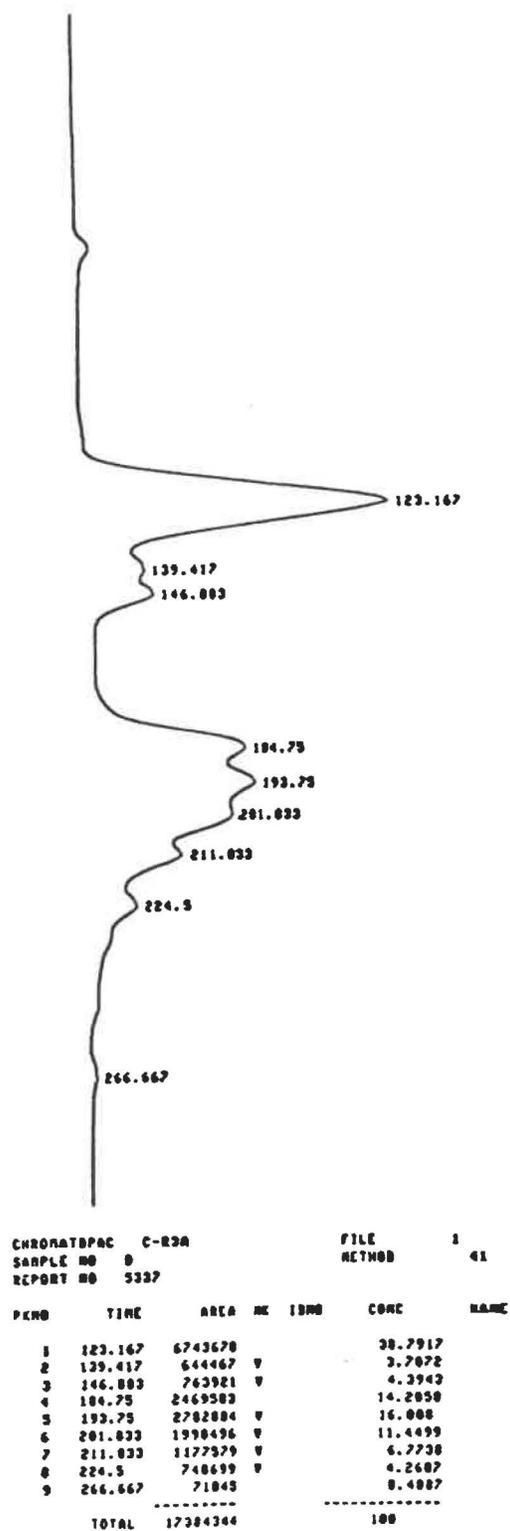
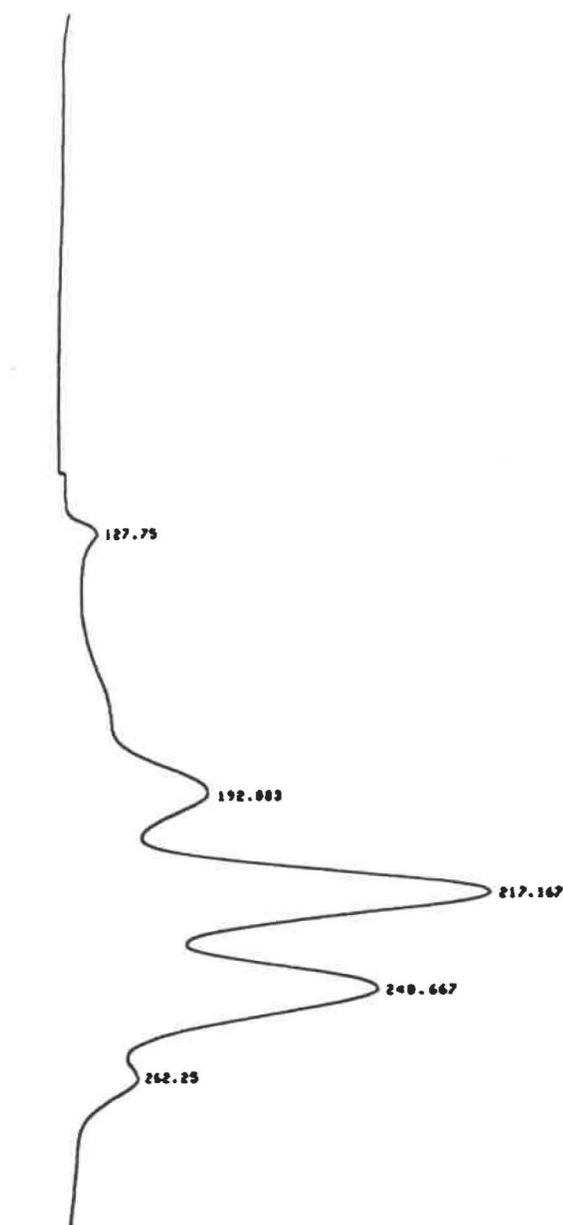


Figure 16

Analyse sur une colonne de Superose-6 des fragments $F(ab')_2$ de l'AMC D8A8F7-A après ultrafiltration avec un Centricon-30



PKNO	TIME	AREA	HE	LNNO	CONC	NARC
1	127.75	5105238			2.0066	
2	192.083	55072056	V		22.509	
3	217.167	93316136	V		38.1295	
4	248.667	76891336	V		31.4265	
5	262.25	14204910	V		5.8384	
TOTAL		244679464			106	

Fig.17 Calibration de la colonne de Superose-6 à un débit de 0.5 ml/min.

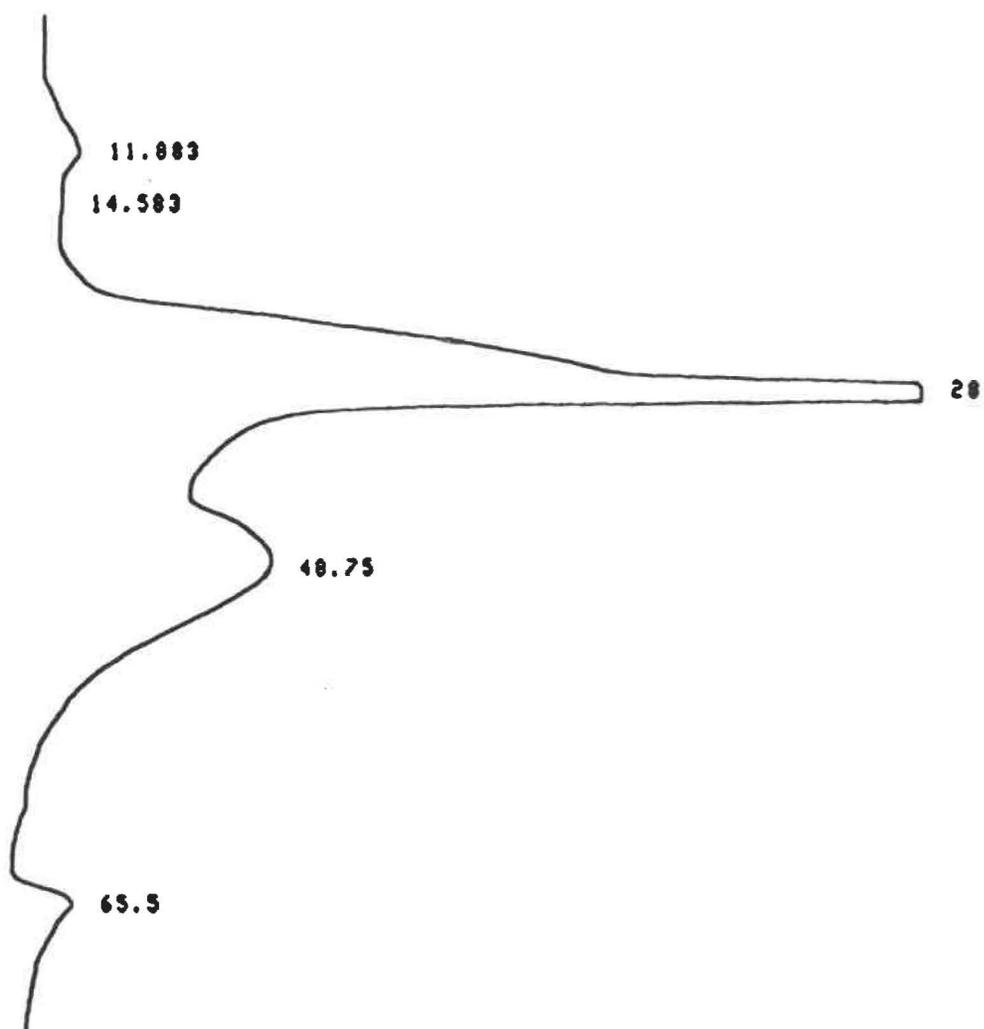
Ces deux Ac ont été couplés avec le SPDP. La figure 18 nous montre l'analyse des Ac bispécifiques formés. Le rendement du couplage final [Ac anti-p(SEA) - Ac anti-P(SEB)] a été de 70%.

3.3 Couplage des anticorps monoclonaux D8A8F7-A et 2E11H1C7

Les deux AMC sélectionnés, D8A8F7 et 2E11H1C7 ont été couplés l'un à l'autre avec le réactif hétérofonctionnel SPDP. Le rendement de ce couplage a été faible, même si la courbe de la cinétique du couplage mesurée par la libération de pyridine-2-thione avait atteint un plateau (fig.19). La courbe d'élu-tion de la colonne de Superose-6 (fig.20) montre que le couplage final entre les AMC D8A8F7 et 2E11H1C7 n'a été que d'environ 45%. Le pic à 246^{ième} minute correspond aux AMC non couplés tel que la courbe de calibration de la colonne nous l'indique. Le pic à 216^{ième} minute, correspond donc aux AMC couplés l'un à l'autre. L'épaule de ce pic indique qu'en plus des dimères formés, des trimères et d'autres oligomères ont probablement aussi été produits.

4. DÉTECTION DES ENTÉROTOXINES AVEC LES ANTICORPS BISPÉCIFIQUES

Les Ac bispécifiques formés avec les Ac polyclonaux de lapins se sont révélés capables de détecter chacune des SES jusqu'à une concentration de 10 ng/mL (fig.21).



CHROMATOPAC C-R3A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 5091

FILE 1
 METHOD 41

PKNO	TIME	AREA	NK	IDNO	CONC	NAME
1	11.083	118037			0.1402	
2	14.583	15456			0.0184	
3	20	58962916			70.0517	
4	40.75	23102414	V		27.4471	
5	65.5	1971743			2.3426	
TOTAL		84170560			100	

Figure 18

Analyse des Ac polyclonaux bispécifiques, sur deux colonnes Protein Pak 300sw montées en série sur un HPLC

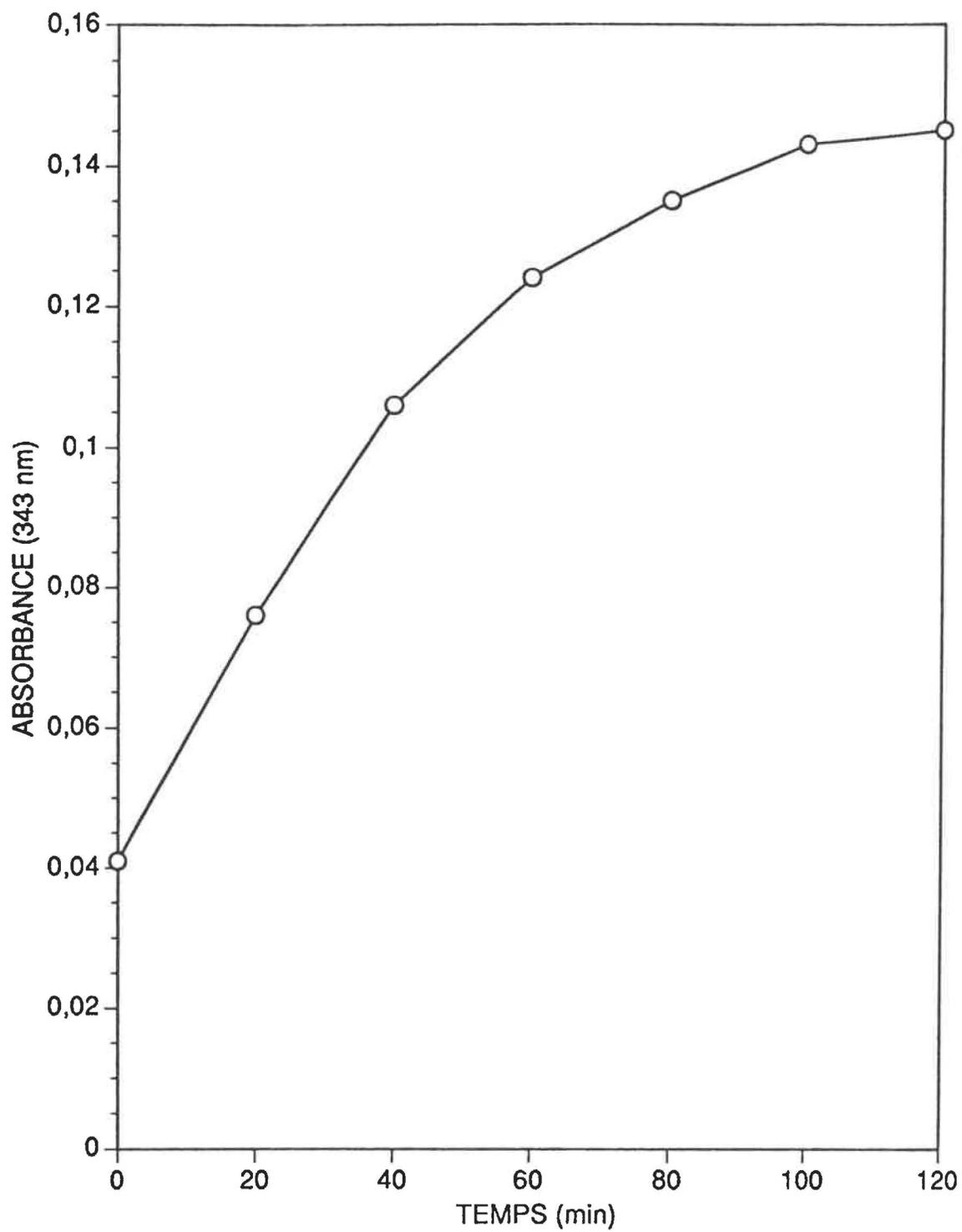


Fig.19 Cinétique de la libération de pyridine-2-thione lors de la formation des AMC bispécifiques

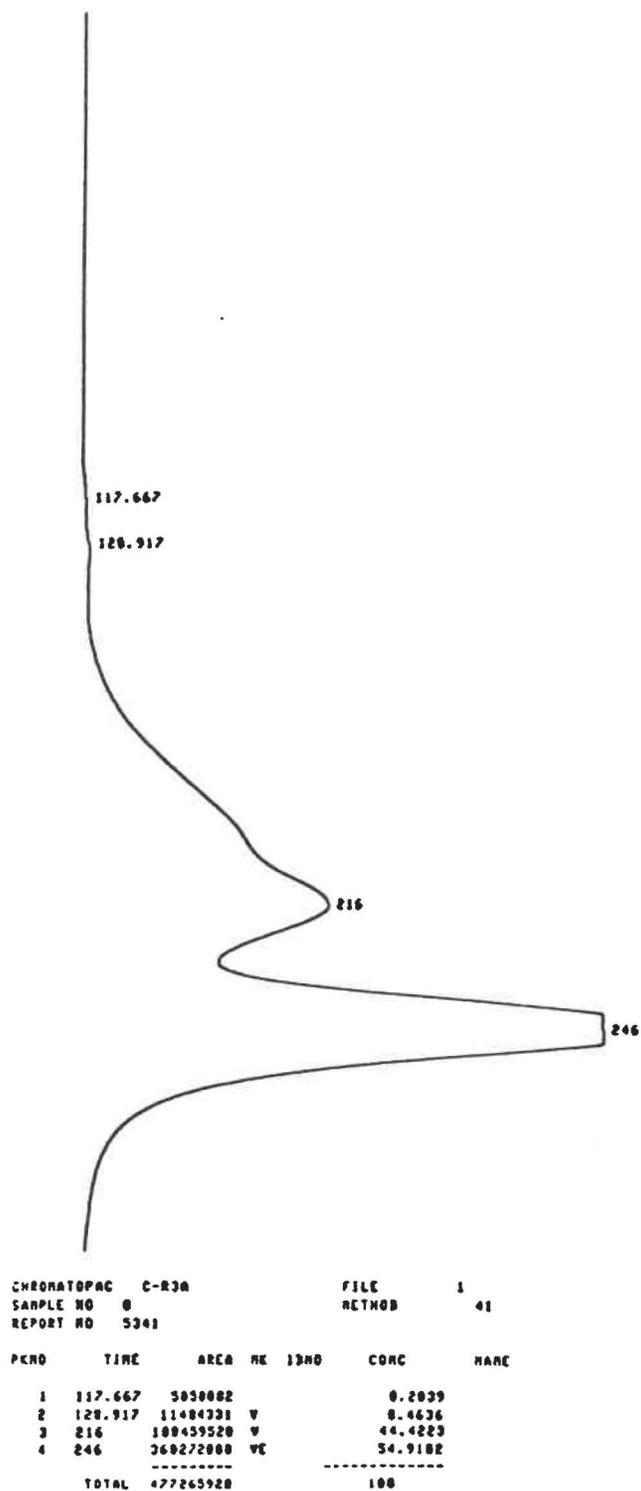


Fig.20 Analyse sur une colonne de Superose-6 des AMC bispécifiques formés

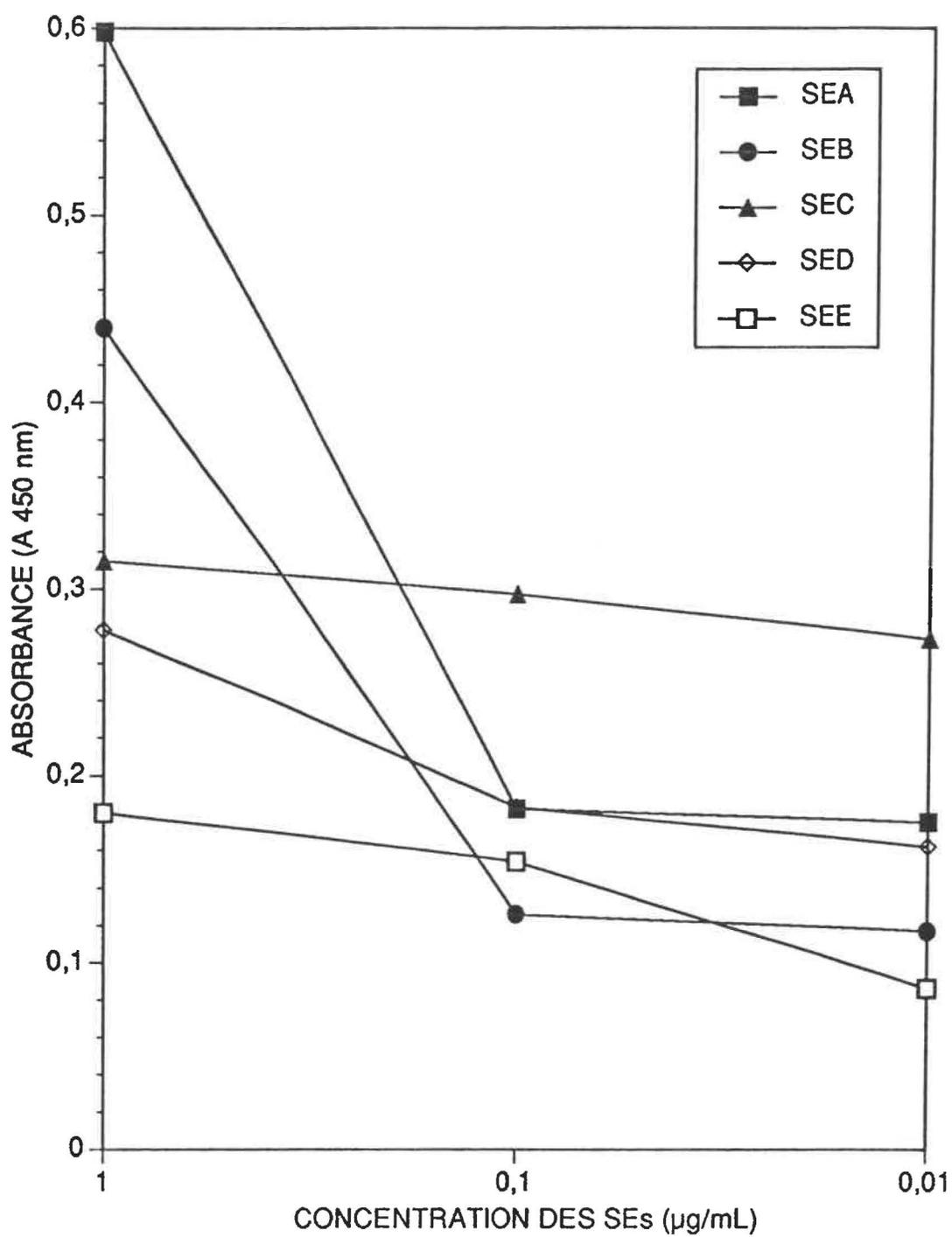


Fig. 21 Détection des SEs par les Ac polyclonaux bispécifiques

Les AMC bispécifiques formés de D8A8F7-A et 2E11H1C7 utilisés à 2 $\mu\text{g/mL}$ lors de tests ELISA indirects ont pu détecter jusqu'à 1 ng/mL de SEB, 30 ng/mL de SEC₁ et 500 ng/mL de SEA; les SED et SEE n'ont pu être détectés (fig.22).

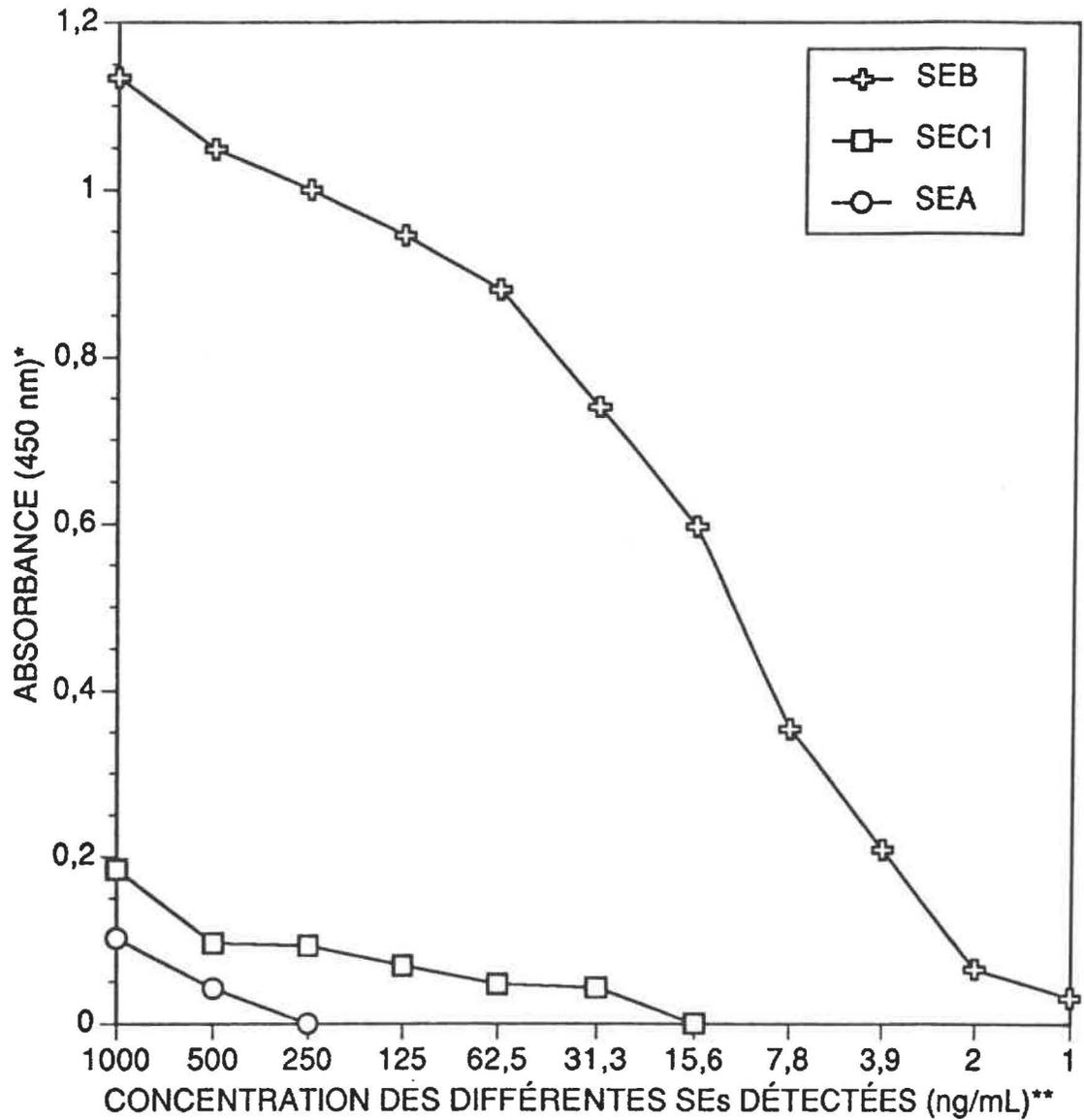


Fig.22 Détection des SEs par l'AMC bispécifique

* La valeur moyenne des contrôles négatifs a été soustraite de chacune des valeurs indiquées

** Les SED et SEE n'ayant pu être détectées, leurs courbes ne sont pas illustrées

DISCUSSION

La détection des aliments contaminés par des SEs grâce à des tests ELISA, est présentement le meilleur moyen de limiter les dégâts dus aux intoxications alimentaires d'origine staphylococcique. Les Ac polyclonaux anti-SEs traditionnellement utilisés tendent à être remplacés par des AMC. Les AMC peuvent être produits en grandes quantités permettant ainsi de bien standardiser chaque test ELISA.

Les sept SEs sérologiquement distinctes possèdent des homologies de séquences d'acides aminés dans leurs structures primaires (MICUSAN et THIBODEAU, 1992). Certaines de ces homologies se traduisent par le partage d'épitopes communs ou semblables à la surface de ces protéines puisque des groupes de chercheurs ont obtenu des AMC ayant des réactions avec plus d'une SE. Les réactions croisées ainsi obtenues divisent les SEs en deux groupes d'homologie. Un premier regroupe les SEB et les SEC₅ et un second les SEA, SED et SEE. Nous avons donc tenté de produire des AMC capables de reconnaître un épitope commun aux SEA, SED et SEE, et d'autres reconnaissant un épitope commun aux SEB et SECs. Comme la présence de n'importe quelle SE dans un produit alimentaire est inadmissible, un test rapide d'identification des SEs peut certainement avoir une application dans l'industrie alimentaire.

La production et la sélection des AMC n'ont pas été faites sans problèmes. Parmi les cinq fusions cellulaires réalisées, quatre visaient l'obtention d'AMC pouvant réagir avec SEA, SED et SEE (FA-1, FA-3, FA-4, et FA-5), tandis que l'autre (FB-2) visait l'obtention d'AMC pouvant reconnaître les SEB et SECs.

Les fusions FA-1 et FA-4 n'ont produit aucun hybridomes dû à un phénomène de cytotoxicité. La fusion FA-3 a aussi été partiellement affectée par cette réaction toxique. Cette fusion a produit 20 hybridomes dont aucun ne sécrétait des Ac anti-SE. Le point commun à ces trois fusions a été l'utilisation de SEA et SEE lors des immunisations. Les SEs possèdent un grand pouvoir mitogène sur les lymphocytes T ainsi que plusieurs autres propriétés superantigéniques encore mal connues. Il est possible que l'effet cytotoxique observé soit une conséquence d'une des propriétés des superantigènes. L'utilisation de SEs entières comme immunogènes pourrait donc être reliée à ces problèmes. Si tel est le cas, l'immunisation de souris avec des peptides synthétiques représentant diverses régions hydrophiliques homologues des SEs pourrait être une alternative de choix.

La fusion FA-5 a produit 18 hybridomes. Des tests ELISA directs ont révélés que seulement sept d'entre eux sécrétaient des Ac réagissant avec au moins l'une des SEs. Les clones

issus de l'hybridome D8 quoique variables dans leurs intensités de réaction étaient particulièrement intéressants, puisque certains d'entre eux, notamment D8A8F7, réagissaient à la fois avec SEA, SED et SEE. Encore aucun groupe n'avait rapporté l'existence d'un tel AMC. Le groupe d'EDWIN (1984) avait décrit un AMC réagissant avec SEA et SEE. D'autre part, MEYER et al. (1984) avaient obtenu plusieurs AMC reconnaissant SEA et SED. L'ensemble de ces résultats confirme donc l'existence d'au moins un épitope commun à toutes ces SEs. Il s'est avéré que les Ac sécrétés par l'hybridome D8A8F7 après avoir été congelé ne réagissaient plus qu'avec SEA (tableau VII). Suite au changement majeur de spécificité observé, ce clone a été renommé D8A8F7-A. Ce sont les cellules du clone D8A8F7-A qui ont été injectées aux souris pour la production de liquide d'ascite.

Nous suggérons deux explications possibles pour ce phénomène d'instabilité. Une première propose que parmi les hybridomes D8A8F7 une des cellules aurait subi une mutation somatique, divisant ceux-ci en deux groupes sécrétant des Ac différents. Dans ce cas l'AMC D8A8F7 serait en fait un mélange de deux AMC, l'un spécifique à SEA, l'autre à SED et SEE. L'une de ces populations n'aurait pas survécu à la congélation.

La deuxième explication suppose que l'hybridome D8 serait issu de la fusion d'un myélome et de deux lymphocytes. Dans ce

cas il serait donc un triome sécrétant un mélange hétérologue d'Ac hybrides, ce qui pourrait expliquer la variabilité des résultats obtenus. Si la seconde hypothèse s'avérait exacte, on pourrait supposer que le stress produit par la congélation aurait affecté le système d'expression génétique de façon à ce que les gènes codant pour les chaînes d'immunoglobulines complémentaires à SEA soient favorisés au détriment des autres situés sur d'autres chromosomes. L'instabilité des hybridomes est un phénomène courant, MAYER et WALKER (1987) supposent que ce phénomène pourrait être dû à la perte de synthèse de chaînes légères ou lourdes d'Ig. Ce phénomène serait lié à la ségrégation des gènes ou à la perte d'un chromosome (fréquent chez les cellules hybrides).

Les AMC D8A8F7-A purifiés des liquides d'ascites ont été recharacterisés par des tests ELISA directs (standard ou compétitif) et des tests ELISA indirects. L'AMC D8A8F7-A s'est révélé avoir une excellente réactivité envers la SEA adsorbée à une surface solide, une affinité moyenne pour la SEA en phase liquide et une faible réactivité avec la SEA lié à un Ac polyclonal de lapin. La faible réactivité de SEA en ELISA indirect pourrait s'expliquer si l'AMC D8A8F7-A reconnaissait un épitope majeur de la SEA qui serait aussi reconnue par la majorité des Ac polyclonaux anti-SEA.

En ce qui concerne la fusion FB-2 provenant de souris

ayant été immunisées avec les SEB et SECs, plus de 200 hybridomes ont été formés sans qu'aucun effet cytotoxique n'ait été observé. De ceux-ci, sept hybridomes produisaient des Ac ayant des réactions croisées avec SEB et SEC₁. Le clone 2E11H1C7 a été celui ayant les meilleures réactions à la fois avec SEB et SEC₁. L'obtention de tels AMC spécifiques à SEB et SEC₁ comme le groupe de THOMPSON (1984) confirme l'existence d'un épitope commun à ces SEs. L'AMC 2E11H1C7 a réagi très fortement en ELISA direct contre SEB et à un niveau un peu moindre contre SEC₁. Au cours des clonages la réactivité contre SEC₁ semble avoir diminué en intensité d'une façon progressive. L'AMC 2E11H1C7 purifié a reconnu un peu mieux la SEB que les SECs en ELISA indirect et compétitif (tableau VII).

Il existe donc sûrement un ou plusieurs épitopes communs ou semblables à l'intérieur de chacun des deux groupes d'homologie. Il est toutefois beaucoup plus improbable de retrouver un épitope commun à toutes les SEs et de réussir à produire un AMC spécifique à cet épitope.

Alors que nos travaux étaient déjà en cours, SHINAGAWA et al. (1991) ont décrit l'obtention d'AMC réagissant contre plusieurs SEs. À partir de cellules de rates immunisées avec les SEA, SEB, SEC₂, SED et SEE, fusionnées avec des cellules myélomateuses, ils ont obtenus 456 hybridomes. De ceux-ci, 15 seulement sécrétaient des Ac anti-SEs. Les SEB et SECs étaient

reconnues par huit d'entre eux, quatre réagissaient avec SEA et SEE, un seul avait des réactions positives avec SEA, SED et SEE. Ils affirment également avoir obtenu trois AMC réagissant contre toutes les SEs. Ceci suppose la présence d'au moins un épitope commun à toutes les SEs, malgré la faible homologie entre certaines d'entre elles. On remarque cependant que ces AMC n'ont qu'une faible affinité pour les SEs. La détection des SEA et SED nécessite 10 ng/mL d'AMC et 100 ng/mL sont nécessaires pour la détection des autres SEs. La faible affinité de leurs AMC envers les SEs (surtout SEC₂) est confirmée par les tests d'inhibition qui nécessitent la présence de 100 µg/mL de SEs. De plus, il n'a pas été démontré que ces AMC ne réagissaient pas aussi avec d'autres protéines.

Le but de ce projet étant la production d'AMC pouvant servir à la détection des SEs présentes dans des extraits alimentaires, il faut considérer l'hétérogénéité du mélange à tester. En effet, celui-ci, en plus de contenir une multitude de protéines propres à l'aliment d'origine, peut être contaminé par d'autres protéines issues de divers microorganismes. Or l'utilisation d'AMC nous assure de l'homogénéité et de la spécificité du réactif, ce qui élimine la grande majorité des réactions croisées possibles avec les protéines autres que les SEs. Les réactions faussement positives sont donc grandement diminuées en comparaison avec l'utilisation d'Ac polyclonaux. Par contre, des aliments contaminés avec une souche de staphy-

locoques peuvent non seulement contenir des SEs mais aussi d'autres protéines telle la SPA. Cette dernière étant connue pour sa propriété de se lier aux fragments Fc des Ac peut donc produire des résultats faussement positifs. La méthode la plus élégante de contourner ce problème est d'éliminer les fragments Fc de certains Ac par une digestion avec de la pepsine. L'isolement des fragments $F(ab')_2$ ainsi obtenus donne un réactif possédant toujours deux sites de liaisons spécifiques à un déterminant antigénique sans aucun site de liaison possible avec la SPA.

Un essai de digestion à la pepsine a donc été réalisé avec l'AMC D8A8F7-A. Il s'est avéré possible de produire de tels fragments $F(ab')_2$. Des pertes de 95% du contenu protéique de départ ont cependant été observées au cours de la digestion de l'AMC. Une partie des pertes est reliée aux différentes étapes de l'isolement des fragments $F(ab')_2$ et le reste dépend de la résistance même de l'Ac à la digestion par la pepsine. La résistance d'un AMC à une digestion pepsinique dépend de l'espèce où il a été produit, de sa classe ainsi que de sa sous-classe. Chaque AMC a sa propre sensibilité à la pepsine (PARHAM, 1983). Le mélange obtenu contient les fragments $F(ab')_2$ désirés ainsi qu'une série de peptides résultant de la digestion des fragments Fc. Les fragments $F(ab')_2$ devant par la suite être couplés via l'utilisation de SPDP doivent être séparés des peptides résiduels pouvant interférer lors du

couplage final. Le SPDP réagit avec certaines chaînes latérales d'acides aminés pouvant se retrouver aussi bien sur les fragments $F(ab')_2$ que sur les peptides. Une ultrafiltration à l'aide d'un Centricon-30 a permis d'augmenter la proportion des fragments $F(ab')_2$ du mélange de 13,5% à 38,8% (fig.14 et 16). Cette étape amène toutefois quelques pertes supplémentaires. La comparaison entre l'analyse sur HPLC des IgG non digérés et digérés (avant l'utilisation du Centricon-30) tel que montré aux figures 14 et 15, indique après intégration des aires sous la courbe, que seulement 18% des AMC ont été digérés. Ainsi on peut conclure que cet AMC est particulièrement résistant à la digestion par la pepsine.

Le faible rendement de cette réaction nous a poussé à résoudre le problème des réactions croisées avec la SPA par un autre moyen. La préincubation des échantillons avec 10% d'IgG de lapin tel que décrit par le groupe de KUFFNER (1988) a éliminé toutes traces de réactions croisées entre les AMC utilisés et la SPA.

Avant de produire des Ac bispécifiques avec les AMC D8A8F7-A et 2E11H1C7, une série de tests préliminaires a été réalisée avec des IgG polyclonales de lapin de spécificités inconnues. Les résultats préliminaires obtenus ont permis d'optimiser la réaction de couplage en identifiant les paramètres importants. Tout d'abord il s'est révélé que les Ac à

coupler devaient avoir une concentration minimale de 5 mg/mL pour l'obtention d'un rendement acceptable. Un autre paramètre important est le ratio molaire utilisé entre le SPDP et les Ac. Une proportion trop faible de SPDP se traduit par une diminution du rendement de la réaction de couplage, alors qu'un ratio trop élevé amène la production de polymères d'Ac. Le rapport optimum déterminé lors de la mise en présence de chaque Ac avec le SPDP a été évalué à 5 molécules de SPDP par molécule d'Ac. La présence de plus d'une molécule de SPDP par Ac favorise la formation de liens entre deux Ac. Les dimères d'Ac produits sont toujours composés de deux Ac différents (fig.3). La présence de plusieurs molécules de SPDP fixées à chaque Ac peut amener la formation de trimères et de tétramères d'Ac. Cette réaction secondaire peut être contrôlée en limitant le nombre de molécules de SPDP fixées par Ac et le temps de réaction entre les deux Ac. Le dosage de la pyridine-2-thione libérée lors de la formation d'un dimère d'Ac plafonne après deux heures de contact entre les Ac (fig.19). Lorsque la réaction est prolongée à 14 heures, seules les proportions de trimères et tétramères augmentent, la quantité de dimères restant à peu près stable. Les molécules de SPDP se fixent aléatoirement sur les chaînes latérales de divers acides aminés des Ac; il peut arriver que certaines de celles-ci bloquent un site de liaison à l'Ag. Ces risques augmentent si plus de deux Ac sont liés l'un à l'autre, c'est pourquoi il faut limiter la formation de trimères et tétramères d'Ac. Quoiqu'il en soit, une majorité

d'Ac reste encore sous forme monomérique.

La réaction de thiolation de l'un des deux Ac par le DTT a été optimisée en remplaçant l'air présent dans le contenant où se déroule cette réaction par de l'azote. Le DTT étant photosensible, le rendement de la réduction a été amélioré en laissant la réaction se dérouler à l'obscurité. L'utilisation d'une colonne de Sephadex G-25 d'une hauteur de 50 cm a été plus efficace que la colonne de type PD-10 pour éliminer les traces de DTT.

Le dernier problème à résoudre était l'analyse du résultat du couplage ainsi que l'isolement des Ac bispécifiques obtenus. L'utilisation de deux colonnes de tamis moléculaire de type Protein Pak 300sw montées en série sur un HPLC a été une technique utile pour l'analyse du rendement du couplage effectué, mais s'est révélée de moindre valeur pour l'isolement des Ac bispécifiques obtenus. Le profil d'élution obtenu, quoique montrant clairement deux pics, l'un correspondant aux Ac non couplés et l'autre aux dimères formés, se chevauchaient largement rendant difficile l'isolement des Ac bispécifiques obtenus. L'utilisation d'une colonne de 80 cm de Sephacryl-300 n'a pu séparer efficacement les monomères des dimères d'Ac. Par contre l'utilisation d'une colonne de Superose-6 de 60 cm montée sur le HPLC a donné une meilleure séparation entre les Ac couplés et non couplés. La qualité de cette séparation a

été augmentée en diminuant le débit à 0,25 mL/min (fig. 20).

Des Ac polyclonaux de lapins anti-SEs ont été couplés dans le but d'étudier si un tel couplage modifiait les réactions entre les Ac utilisés et les Ag auxquels ils sont spécifiques. Pour ce faire nous avons utilisé un Ac de lapin ayant été immunisé avec le peptide synthétique pSEA(225-233). Cet Ac réagit contre SEA, SED et SEE. Le second Ac utilisé réagissant avec SEB et les SECs a été obtenu par l'immunisation d'un lapin avec pSEB(13-25). Le couplage de ces deux Ac a été excellent avec 70% d'Ac bispécifiques formés.

Les Ac bispécifiques ainsi formés ont été utilisés pour la détection des SEs. Chacune d'entre elles a pu être détectée jusqu'à 10 ng/mL ce qui correspond à la même sensibilité qu'avaient ces Ac avant le couplage. La liaison de deux Ac par le SPDP ne modifie donc pas leurs réactions avec leurs Ag spécifiques.

Le couplage des AMC D8A8F7-A et 2E11H1HC7 avec le réactif hétérofonctionnel SPDP a pu être effectué suite à l'optimisation de diverses étapes de la réaction. La figure 20 nous permet de voir que les AMC bispécifiques produits représentent 45% du contenu protéique total.

La limite de détection suggérée pour les SEs est de 1 ng

par gramme de nourriture à tester. Les AMC bispécifiques obtenus ont permis la détection que des SEA, SEB et SEC₁ aux concentrations respectives de 500, 1 et 30 ng/mL. Ainsi, en concentrant les échantillons à tester, l'AMC bispécifique pourrait détecter les SEA, SEB et SECs à l'intérieur des limites suggérées. Nous n'avons pas obtenu le réactif reconnaissant toutes les SEs connues tel que désiré. L'absence de réactivité envers les SED et SEE de même que la faible reconnaissance de SEA est dû aux modifications qu'a subies l'AMC D8A8F7. Nous avons cependant montré que le couplage chimique de deux AMC est un moyen de produire un réactif immunospécifique pouvant reconnaître des Ag différents.

CONCLUSION

Notre objectif de recherche a été atteint seulement en partie puisque nous n'avons pas obtenu un réactif immunospécifique capable de reconnaître toutes les SEs. Seules les SEA, SEB et SECs ont pu être détectées.

Nous avons tout de même démontré qu'il était possible d'obtenir un AMC capable de reconnaître à la fois les SECs et SEB. La différence d'intensité de la réaction de l'AMC 2E11H1C7 envers SEB et les SECs suppose la présence d'un épitope semblable chez ces deux SEs.

L'obtention de l'AMC D8A8F7 reconnaissant les SEA, SED et SEE a été plus ardue. Sur un total de quatre fusions cellulaires, issues d'un total de dix souris, seulement trois hybridomes sécrétant des Ac anti-SEs ont été obtenus. L'hybridome D8A8F7 a sécrété des AMC réagissant avec SEA, SED et SEE. Suite à une congélation l'hybridome a subi une modification génétique d'origine inconnue qui a modifié la spécificité des AMC libérés. Les nouveaux AMC ont été capables de réagir seulement avec SEA.

Nous avons cependant démontré qu'il était possible de construire des AMC bispécifiques pouvant être utilisés comme réactif de détection de SEs lors de tests ELISA sans que leurs

spécificités ou leurs affinités ne soient modifiées.

Nous croyons que la construction d'un AMC bispécifique capable de reconnaître toutes les SEs dans un test rapide de type ELISA est possible à condition qu'un AMC reconnaissant SEA, SED et SEE puisse être obtenu. Un tel Ac pourrait être réalisé en utilisant comme agent immunisant, des peptides synthétiques provenant de la région homologue de ces SEs.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements à tous les membres de l'Institut Armand-Frappier, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement:

Le Dr Valériu Micusan pour son encadrement, sa disponibilité et ses conseils judicieux;

Madame Louise Paris-Nadon pour son aide et ses conseils techniques ainsi que pour son support moral quotidien;

Madame Nicole Gagnon et toute l'équipe du Dr Jacqueline Lecomte pour leur patience et leur persévérance lors de la production des Ac monoclonaux;

Monsieur Denis Minville pour son aide technique;

Et surtout, je voudrais remercier les membres de ma famille pour leur appui et leur compréhension.

BIBLIOGRAPHIE

- ACHER DL, WESS JA et HM JOHNSON. 1981. Inverse relationship between immune interferon induction and mitogen effects on the maturation of the primary antibody response. *Immunopharmacology* 3: 71-81.
- AVENA RM et MS BERGDOLL. 1967. Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, Staphylococcus aureus strain 361. *Biochemistry* 6: 1474-1480.
- BAIRD-PARKER AC. 1990. The Staphylococci: an introduction. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement* 1S-8S.
- BARBER MA. 1914. Milk poisoning due to a type of Staphylococcus albus occurring in the udder of healthy cow. *Philipp. J. Sci.-Sect. B* 2: 515-519.
- BAYLES KW et JJ IANDOLO. 1989. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J. Bacteriol.* 171: 4799-4806.
- BERGDOLL MS. 1970. "Enterotoxins", dans Monties TC, Kadis S et SJ Ajl (eds.): *Microbial toxins*. New York. Academic Press. 265-326.
- BERGDOLL MS. 1983. "Enterotoxins", dans: Staphylococci and staphylococcal infections.(2). Adlam C et Estmon CSF (eds.) London. Academic Press. 559-597.
- BERGDOLL MS. 1989. "Staphylococcus aureus", dans: *Foodborne Bacterial Pathogens*. Doyle MP (ed.) New York. Marcel Dekker. 463-523.
- BERGDOLL MS, BORJA CR et RM AVENA. 1965. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *J. Bacteriol.* 90: 1481-1485.
- BERGDOLL MS, REISER R et J SPITZ. 1976. Staphylococcal enterotoxins- Detection in food. *Food technology* 30: 80-84.
- BERGDOLL MS, ROBBINS RN, WEISS K, BORJA CR, HUANG Y et FS CHU. 1973. The staphylococcal enterotoxins: similarities. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 1: 390-396.
- BERGDOLL MS, SUGIYAMA H et GM DACK. 1959. Staphylococcal Enterotoxin. I. Purification. *Arch. Biochem. Biophys.* 85: 62-69.

- BETLEY MJ et JJ MEKALANOS. 1988. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* 170: 34-41.
- BOHACH GA et PM SCHLIEVERT. 1987a. Expression of staphylococcal enterotoxin C1 in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 55: 428-432.
- BOHACH GA et PM SCHLIEVERT. 1987b. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol. Gen. Genet.* 209: 15-20.
- BORJA CR, FANNING E, HUANG IY et MS BERGDOLL. 1972. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E. *J. Biol. Chem.* 247: 2456-2463.
- BORJA CR et MS BERGDOLL. 1967. Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137. *Biochemistry* 6: 1467-1473.
- BRENNAN M, DAVISON PF et H PAULUS. 1985. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science* 229: 81-83.
- CARLSON R, FISHER H et HO SJOGREN. 1988. Binding of staphylococcal enterotoxin A to accessory cells is a requirement for its ability to activate human T cells. *J. Immunol.* 140: 2484-2488.
- CARLSSON J, DREVIN H et R AXEN. 1978. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. *Biochem. J.* 173: 723-737.
- CASMAN EP. 1960. Further serological studies of staphylococcal enterotoxins. *J. Bacteriol.* 79: 849-856.
- CASMAN EP, BENNETT RW, DORSEY AE et JA ISSA. 1967. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *J. Bacteriol.* 94: 1875-1882.
- CHALITA T et RS GEHA. 1992. Superantigens. *Curr. Opin. Immunol.* 4: 74-78.
- CHANG HC et MS BERGDOLL. 1979. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. *Biochemistry* 18: 1937-1942.
- COLLINS WS, JOHNSON AD, METZGER JF et RW BENNETT. 1973. Rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Microbiol.* 25: 774-777.

BETLEY MJ et JJ MEKALANOS. 1988. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* 170: 34-41.

BOHACH GA et PM SCHLIEVERT. 1987a. Expression of staphylococcal enterotoxin C1 in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 55: 428-432.

BOHACH GA et PM SCHLIEVERT. 1987b. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol. Gen. Genet.* 209: 15-20.

BORJA CR, FANNING E, HUANG IY et MS BERGDOLL. 1972. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E. *J. Biol. Chem.* 247: 2456-2463.

BORJA CR et MS BERGDOLL. 1967. Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137. *Biochemistry* 6: 1467-1473.

BRENNAN M, DAVISON PF et H PAULUS. 1985. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science* 229: 81-83.

CARLSON R, FISHER H et HO SJOGREN. 1988. Binding of staphylococcal enterotoxin A to accessory cells is a requirement for its ability to activate human T cells. *J. Immunol.* 140: 2484-2488.

CARLSSON J, DREVIN H et R AXEN. 1978. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. *Biochem. J.* 173: 723-737.

CASMAN EP. 1960. Further serological studies of staphylococcal enterotoxins. *J. Bacteriol.* 79: 849-856.

CASMAN EP, BENNETT RW, DORSEY AE et JA ISSA. 1967. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *J. Bacteriol.* 94: 1875-1882.

CHALITA T et RS GEHA. 1992. Superantigens. *Curr. Opin. Immunol.* 4: 74-78.

CHANG HC et MS BERGDOLL. 1979. Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. *Biochemistry* 18: 1937-1942.

COLLINS WS, JOHNSON AD, METZGER JF et RW BENNETT. 1973. Rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Microbiol.* 25: 774-777.

- COTTON RGH et C MILSTEIN. 1973. Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature* 244: 42-43.
- COUCH JL, SOLTIS MT et MJ BETLEY. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.* 170: 2954-2960.
- DACK GM, CARY WE, WOOLPERT O et H WIGGERS. 1930. Outbreak of food poisoning proved to be due to yellow hemolytic *Staphylococcus*. *J. Prev. Med.* 4: 167-175.
- DELLABONA P, PECCOUD J, KAPPLER J, MARRACK P, BENOIST C et D MATHIS. 1990. Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell* 62: 1115-1121.
- DENNISON GA. 1936. Epidemiology and symptomatology of *Staphylococcus* food poisoning. *Am. J. Publ. Health* 26: 1168-1175.
- DOLMAN CE et RJ WILSON. 1940. The kitten test for *Staphylococcus* enterotoxin. *Can. Publ. Health J.* 31: 68-71.
- DONNELLY CB, LESLIE JE, BLACK LA et KH LEWIS. 1967. Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. *Appl. Microbiol.* 15: 1382-1387.
- DONNELLY RP et TJ ROGERS. 1982. Immunosuppression induced by staphylococcal enterotoxin B. *Cell. Immunol.* 72: 166-177.
- EDWIN C, TATINI SR, STROBEL RS et SK MAHESWARAN. 1984. Production of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1171-1175.
- FAST DJ, SCHLIEVERT PM et RD NELSON. 1989. Toxic shock syndrome-associated staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins are potent inducers of tumor necrosis factor production. *Infect. Immun.* 57: 291-294.
- FEY H, PFISTER H et O RUEGG. 1984. Comparative evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assay systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D. *J. Clin. Microbiol.* 19: 34-38.
- FLEICHER B et H SCHREZENMEIER. 1988. T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonal variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *J. Exp. Med.* 167: 1697-1707.

GASPER E, HEIMSCH RC et AW ANDERSON. 1973. Quantitative detection of type A staphylococcal enterotoxin by Laurell electroimmunodiffusion. *Appl. Microbiol.* 25: 421-426.

GLENNIE MJ, MCBRIDE HM, WORTH AT et GT STEVENSON. 1987. Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J. Immunol.* 139: 2367-2375.

GREAVES M, JANOSSY G et M DOENHOFF. 1974. Selective triggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens. *J. Exp. Med.* 170: 1-18.

HALPIN-DOHNALEK MI et EH MARTH. 1989. Staphylococcus aureus: Production of extracellular compounds and behaviour in foods. *J. Food Protec.* 52: 267-282.

HAMMON WM. 1941. Staphylococcus enterotoxin: an improved cat test, chemical and immunological studies. *Am. J. Publ. Health* 31: 1191-1198.

HUANG IY, HUGHES JL, BERGDOLL MS et EJ SCHANTZ. 1987. Complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin A. *J. Biol. Chem.* 262: 7006-7013.

HUANG IY et MS BERGDOLL. 1970. The primary structure of staphylococcal enterotoxin B. II. Isolation, composition, and sequence of chymotryptic peptides. *J. Biol. Chem.* 245: 3511-3517.

IANDOLO JJ. 1989. Genetic analysis of extracellular toxins of Staphylococcus aureus. *Ann. Rev. Microbiol.* 43: 375-402.

JANEWAY CA JR, RATH S et J YAGI. 1991. V B selective elements: self and non-self. *Behring Ins. Mitt.* 177-182.

JOHNSON HM, BLALOCK JE et S BARON. 1977. Separation of mitogen-induced suppressor and helper cell activities during inhibition of interferon production by cyclic AMP. *Cell. Immunol.* 33: 170-179.

JOHNSON HM, BUKOVIC JA, KAUFFMAN PE et JT PEELER. 1971. Staphylococcal enterotoxin B: solid-phase radioimmunoassay. *Appl. Microbiol.* 22: 837-841.

JONES CL et SA KHAN. 1986. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 166: 29-33.

KAPPLER J, KOTZIN B, HERRON L, GELFAND EW, BIGLER RD, BOYLSTON A, CARREL S, POSNETT DN, CHOI Y et P MARRACK. 1989. V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 244: 811-813.

KARPOVSKY B, TITUS JA, STEPHANY DA et DM SEGAL. 1984. Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies. *J. Exp. Med.* 160: 1686-1701.

KAWAGUCHI-NAGATA K, OKAMURA H, SHOJI K, KANAGAWA H, SEMMA M et K SHINAGAWA. 1985. Immunomodulating activities of staphylococcal enterotoxins. I. Effects on in vivo antibody responses and contact sensitivity reaction. *Microbiol. Immunol.* 29: 183-193.

KOHLER G et C MILSTEIN. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.

KOHLER G et C MILSTEIN. 1976. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519.

KUFFNER TA, MCKINNEY RM, WELLS DE, REEVES MW, HUNTER SB et BD PLIKAYTIS. 1988. Two-site monoclonal antibody quantitative ELISA for toxic shock syndrome toxin-1. *J. Immunol. Methods* 109: 85-92.

LANDFORD MP, STANTON GJ et HM JOHNSON. 1978. Biological effects of staphylococcal enterotoxin A on human peripheral lymphocytes. *Infect. immun.* 22: 62-68.

LAPEYRE C, KAVERI SV, JANIN F et AD STROSBERG. 1987. Production and characterization of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxins: use in immunodetection and immunopurification. *Mol. Immunol.* 24: 1243-1254.

LIU MA, KRANZ DM, KURNICK JT, BOYLE LA, LEVY R et HN EISEN. 1985. Heteroantibody duplexes target cells for lysis by cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A* 82: 8648-8652.

MAYER RJ et JH WALKER. 1987. "Production and use of monoclonal antibodies" dans: *Immunochemical methods in cell and molecular biology*. London. Academic Press. 97-177.

MEYER RF, MILLER L, BENNETT RW et JD MACMILLAN. 1984. Development of a monoclonal antibody capable of interacting with five serotypes of Staphylococcus aureus enterotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 47: 283-287.

MICUSAN VV, GAGNON F et AR BHATTI. 1992. Isolation of Staphylococcal enterotoxins by immunoaffinity on hydrazide derivatized solid support. ASM 92nd General meeting-Abstract 43.

MICUSAN VV et J THIBODEAU. 1993. Superantigens of microbial origin. Semin. Immunol. sous presse.

MILSTEIN C et AC CUELLO. 1983. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. Nature 305: 537-540.

MILSTEIN C et AC CUELLO. 1984. Hybrid hybridomas and the production of bi-specific monoclonal antibodies. Immunol. Today 5: 299-304.

MOLLICK JA, COOK RG et BR RICH. 1989. Class II MHC molecules are specific receptors for Staphylococcus enterotoxin A. Science 244: 817-820.

MORSE SA et RA MAH. 1967. Microtiter hemagglutination-inhibition assay for staphylococcal enterotoxin B. Appl. Microbiol. 15: 58-61.

NAUM M . 1991. Production et caractérisation d'antisérums dirigés contre les entérotoxines de Staphylococcus aureus, obtenus avec des peptides synthétiques dérivés de la molécule native. S.l. S.n. (Mémoire présenté à l'Institut Armand-Frappier comme exigence partielle de la maîtrise en microbiologie appliquée). 130 p.

NISONOFF A et MN RIVERS. 1961. Recombination of univalent antibody fragments of different specificity. Arch. Biochem. Biophys. 93: 460-462.

NITTA T, YAGITA H, AZUMA T, SATO K et K OKUMURA. 1989. Bispecific F (ab')₂ monomer prepared with anti-CD3 and anti-tumor monoclonal antibodies is most potent in induction of cytotoxicity of human T cells. Eur. J. Immunol. 19: 1437-1441.

NOTERMANS S et CJ HEUVELMAN. 1983. Combine effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of Staphylococcus aureus. J. Food Sci 48: 1832-1840.

OUCHTERLONY O. 1958. "Diffusion in gel methods for immunological analysis", dans Kallos P et BH Waksman (eds.): Progress in allergy.(V)1-78.

PARHAM P. 1983. On the fragmentation of monoclonal IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} from BALB/c mice. J. Immunol. 131(6): 2895-2902.

PEAVY DL, ADLER WH et RT SMITH. 1970. The mitogenic effects of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B on mouse spleen cells and human peripheral lymphocytes. J. Immunol. 105: 1453-1458.

PINTO M, TORTEN M et SC BIRNBAUM. 1978. Suppression of the in vivo humoral and cellular immune response by staphylococcal enterotoxin B (SEB). Transplantation 25: 320-323.

READING C. 1981. dans: Hybrydomas and cellular immortality. Tom BH et JP Allison (eds.)New York. Plenum Press. 235-250.

REISER R, CONAWAY D et MS BERGDOLL. 1974. Detection of staphylococcal enterotoxin in foods. Appl. Microbiol. 27: 83-85.

REISER RF, ROBBINS RN, NOLETO AL, KHOE GP et MS BERGDOLL. 1984. Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C3. Infect. Immun. 45: 625-630.

ROBBINS R, GOULD S et MS BERGDOLL. 1974. Detecting the enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus strains. Appl. Microbiol. 28: 946-950.

RUSSEL JK, PONTZER CH et HM JONHSON. 1991. Both α -helices along major histocompatibility complex binding cleft are required for staphylococcal enterotoxin A function. Proc. Natl Acad. Sci. 88: 7228-7232.

SAUNDERS GC et ML BARTLETT. 1977. Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A. Appl. Environ. Microbiol. 34: 518-522.

SCHANTZ EJ, ROESSLER WG, WOODBURN MJ, LYNCH JM, JACOBY HM, SILVERMAN SJ, GORMAN JC et L SPERO. 1972. Purification and some chemical and physical properties of staphylococcal enterotoxin A. Biochemistry 11: 360-366.

SCHMIDT JJ et L SPERO. 1983. The complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin C1. J. Biol. Chem. 258: 6300-6306.

SCHREUBER PH, MUSSMANN H, BECK G et DK HAMMER. 1983. Direct skin test in highly sensitised guinea pigs for rapid and sensitive determination of staphylococcal enterotoxin B. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1351-1356.

SHAFER WM et JJ IANDOLO. 1978. Staphylococcal enterotoxin A: a chromosomal gene product. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 389-391.

SHALITA Z, HERTMAN I et S SARID. 1977. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 129: 317-325.

SHINAGAWA K, KANAZAWA, MATSUSAKA N, SIGII S et K NAGATA. 1991. Murine monoclonal antibodies reactive with staphylococcal enterotoxins A, B, C2, D and E. *FEMS Microbiol. Lett.* 80: 35-40.

SHINGAKI MH, IGARISHI H, FUJIKAWA H, USHIODA T, TERAYAMA T et S SAKAI. 1981. Study on reversed passive latex agglutination for the detection of staphylococcal enterotoxins A-C. *Ann. Rep. Tokyo Metrop. Res. Lab. Publ. Health* 46: 128-131.

SILVERMAN SJ, KNOTT AR et M HOWARD. 1968. Rapid, sensitive assay for staphylococcal enterotoxin and a comparison of serological methods. *Appl. Microbiol.* 16: 1019-1023.

SINGH BR, EVENSON ML et MS BERGDOLL. 1988. Structural analysis of staphylococcal enterotoxins B and C1 using circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 27: 8735-8741.

SINGH BR et MJ BETLEY. 1989. Comparative structural analysis of staphylococcal enterotoxins A and E. *J. Biol. Chem.* 264: 4404-4011.

SMITH BG et HM JOHNSON. 1975. The effect of staphylococcal enterotoxins on the primary *in vitro* immune response. *J. Immunol.* 115: 575-578.

SPERO L, WARREN JR et JF METZGER. 1973. Effect of single peptide bond scission by trypsin on the structure and activity of staphylococcal enterotoxin B. *J. Biol. Chem.* 248: 7289-7294.

STIFFLER-ROSENBERG G et H FEY. 1978. Simple assay for staphylococcal enterotoxins A, B, and C: modification of enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 8: 473-479.

STUCHBURY T, SHIPTON M, NORRIS R, MALTHOUSE JP, BROCKLEHURST K, HERBERT JA et H SUSCHITZKY. 1975. A reporter group delivery system with both absolute and selective specificity for thiol groups and an improved fluorescent probe containing the 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole moiety. *Biochem. J.* 151: 417-432.

SUGIYAMA H et T HAYAMA. 1965. Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in the monkey. *J. Infect. Dis.* 115: 330-336.

SURGELLA MJ, BERGDOLL MS et GM DACK. 1953. Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by monkey-feeding test. *J. Lab. Clin. Med.* 41: 782-788.

THOMPSON NE, BERGDOLL MS, MEYER RF, BENNET RW, MILLER L et JD MAMILLAN. 1985. "Monoclonal antibodies to the enterotoxins and to the toxic shock syndrome toxin produced by Staphylococcus aureus", dans DE Macario et S Macario (eds.): *Monoclonal antibodies against bacteria*. Academic Press. 23-59.

THOMPSON NE, KETTERHAGEN MJ et MS BERGDOLL. 1984. Monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxins B and C: cross-reactivity and localization of epitopes on tryptic fragments. *Infect. Immun.* 45: 281-285.

TRANter HS et RD BREHM. 1990. Production, purification and identification of the staphylococcal enterotoxins. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 19: 109S-122S.

TURNBULL PC. 1979. Food poisoning with special reference to *Salmonella* -- its epidemiology, pathogenesis and control. *Clin. Gastroent.* 8: 663-714.

UCHIYAMA T, KAMAGATA Y, YAN XJ, KAWACHI A, FUJIKAWA H, IGARASHI H et M OKUBO. 1989. Relative strength of the mitogenic and interleukin-2-production-inducing activities of staphylococcal exotoxins presumed to be causative exotoxins of toxic shock syndrome: toxic shock syndrome toxin-1 and enterotoxins A, B and C to murine and human T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 75: 239-244.

WHITE J, HERMAN A, PULLEN AM, KUBO R, KAPPLER J et P MARRACK. 1989. The V β -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 56: 27-35.

WILLIAMS REO. 1963. Healthy carriage of Staphylococcus aureus: its prevalence and importance. *Bacteriol. Rev.* 27: 56-71.

WOOLPERT OC et GM DACK. 1933. Relation of gastro-intestinal
poison to other toxic substances produced by Staphylococci.
J. Infect. Dis. 52: 6-19.