

## PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI - PROTEINE A DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS : OPTIMISATION D'UNE TECHNIQUE E.L.I.S.A. POUR LE CONTROLE DE QUALITE DU LAIT

*Reçu le 23/10/2004 – Accepté le 24/11/2007*

### Résumé

L'objectif de cet article est la production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine A de *S. aureus* et leur utilisation pour apprécier la qualité bactériologique du lait. A cet effet, un protocole d'immunisation est mis au point pour déceler, dans un lot d'animaux, les bons répondeurs à l'antigène injecté. La réalisation d'un tableau croisé nous a permis d'optimiser les différentes concentrations des différents réactifs utilisés pour le test E.L.I.S.A. Les dilutions de :

- 1/1000 pour l'antisérum de souris anti-pSA et 1/2000 pour l'antisérum de lapin anti-pSA,
- 1/4000 pour l'antisérum de souris anti-Sc et 1/500 pour l'antisérum de lapin anti-pSA,
- et 1/2000 pour le polyclonal de souris anti-Sj et 1/500 pour l'antisérum de lapin anti-pSA,

ont été retenues. L'application du test E.L.I.S.A. optimisé à la recherche de *S. aureus* dans différents échantillons de lait a donné des résultats satisfaisants en comparaison avec ceux obtenus par la méthode bactériologique. En effet la sensibilité, la reproductibilité ainsi que la possibilité d'analyse d'un grand nombre d'échantillons à la fois en un temps réduit font de la méthode immunochimique une méthode de choix capable de remplacer les méthodes microbiologiques classiques actuellement utilisées.

**Mots clés :** anticorps polyclonaux, *S. aureus*, protéine A, E.L.I.S.A., lait.

### Abstract

The aim of this project is to produce polyclonal antibodies directed against the *Staphylococcus aureus* protein A and their use to evaluate the bacteriological quality of milk.

In this context, an immunisation procedure was set up to test and detect in a batch of animals the good responder to the injected antigen. Furthermore, to optimise all parameters of retained ELISA test, a cross-table was conceived by using various concentrations of different reagents allowed us to select the optimal following dilutions:

- 1/1000 for mouse antibodies anti-pSA and 1/2000 for rabbit antibodies anti-pSA,
- 1/4000 for mouse antibodies anti-Sc and 1/500 for rabbit antibodies anti-pSA,
- 1/2000 for mouse antibodies anti-Sj and 1/500 for rabbit antibodies anti-pSA.

The application of optimised ELISA test to search and detect *S. aureus* germs in different samples of milk showed very satisfying results comparing to those obtained by bacteriological method. In deed, the sensitivity and the reproducibility, as well as the possibility to analyse an important number of samples at once in short time make the immunochemical method the best choice of test able to replace standard bacteriological methods used currently.

**Keywords:** polyclonal antibodies, *S. aureus*, protein A, ELISA, milk.

**M. BENALI**<sup>1</sup>  
**Y. BELKESSAM**  
**B. KHALED MEGHIT**  
**S. MOULESSEHOUL**  
**S. BELBRAOUE**<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biotoxicologie Centre de recherche, Université Djillali Liabes, Sidi-Bel-Abbès 22000, Algérie.

<sup>2</sup> ESANEF - Université de Moncton – NB – Canada – E1A 3A9

ملخص

*S. aureus* " "

: E.L.I.S.A.

( ) " " 1/2000 ( ) " " 1/1000 •

( ) " " 1/500 ( ) *S. aureus* 1/4000 •

" " 1/500 ( ) *S. aureus* 1/2000 •

( )

E.L.I.S.A.

, ELISA , , *S. aureus* , : \_\_\_\_\_

Les toxi-infections alimentaires sont de 300 à 350 fois plus nombreuses que ne l'indique le nombre des cas signalés [11]. Elles résultent de la consommation d'aliments contaminés par un micro-organisme nocif ou un agent pathogène capable de produire des toxines [3].

Les staphylocoques sont au deuxième rang des bactéries responsables d'intoxication alimentaire après les salmonelles [4].

Dans le cas du lait, la maîtrise de la qualité hygiénique doit satisfaire à des normes de nature réglementaires imposées pour les échanges commerciaux. Parmi les critères habituellement considérés figurent la concentration en cellules somatiques, la flore totale, la présence et/ou l'importance de la contamination par des micro-organismes présentant un risque potentiel pour la santé publique tel que les *Staphylococcus aureus* [8].

Malgré les recommandations inhérentes aux mesures d'hygiène drastiques que doivent prendre les éleveurs et fournisseurs de lait, certaines manipulations peuvent contaminer ce produit qui devient nocif pour le consommateur. En outre certains traitements thermiques sublétaux permettent à certaines souches de *S. aureus* de retrouver leur capacité de toxino-génèse [7]. C'est pourquoi la détection et le dénombrement de *S. aureus* ou des staphylocoques à coagulase positive (SCP), conservent leur intérêt en microbiologie alimentaire et le dosage direct des Entérotoxines staphylococciques qui restent l'unique moyen de déterminer l'innocuité d'un aliment soupçonné d'être contaminé, peut être erroné.

Or, Les méthodes de culture standard utilisées pour la détection des micro-organismes dans les aliments sont souvent laborieuses et prennent du temps, puisqu'elles demandent 3 à 7 jours avant qu'on puisse décréter qu'un produit laitier est propre à la consommation. En effet, dans l'aliment incriminé, ces bactéries se présentent souvent à l'état sublétal et en nombre relativement faible comparé à la flore totale, ce qui nécessite des étapes d'enrichissement non sélectif pour toute approche bactériologique. Cette méthode oblige donc un stockage onéreux d'importantes quantités d'aliments en attendant les résultats du dosage [11].

A la lumière de ces considérations l'utilisation de techniques immunochimiques dont les performances d'analyse dans le domaine agroalimentaire sont démontrées s'avère intéressante [10],[14].

A cet effet et en vue de rechercher *S. aureus* dans le lait nous avons adopté un protocole d'immunisation pour la production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine A (pSA) produite exclusivement par ces micro-organismes. Ces anticorps d'une spécificité déterminée seront donc utilisés pour un dosage immunochimique de type E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) afin d'identifier ou de quantifier les antigènes recherchés.

Cette réalisation est assujettie à un protocole d'immunisation approprié permettant dans un lot d'animaux d'étudier et de déceler les bons répondeurs à l'antigène utilisé. Une fois les antisérums récupérés, les conditions optimales du titrage sont déterminées permettant l'application du test E.L.I.S.A. à l'identification des *S. aureus* dans le lait.

## MATERIELS ET METHODES

### Préparation des antigènes

- 468,75 µg de protéine A, principal constituant de la paroi bactérienne des *S. aureus* (pSA), lyophilisée (Sigma, lot 112H682) sont solubilisés dans 2,5 ml de tampon phosphate 0,01 M pH 7,4 contenant NaCl 0,15 M (PBS).

- Une solution de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* 12600 des laboratoires ATCC « American type culture collection ») contenant une charge bactérienne de 10<sup>5</sup> UFC/ml est traitée chimiquement ou physiquement pour constituer les échantillons suivants :

- Solution de *S. aureus* traitée par la chaleur (Sc) à 85°C pendant 10 minutes [7].

- Solution de *S. aureus* traitée par l'hypochlorite de sodium (Sj) à 8° [5].

L'ensemencement des deux solutions bactériennes Sc et Sj sur milieu solide (Chapman) par méthode de stries suivie d'une incubation à 37°C pendant 24 heures ne révèle aucune forme de colonie, confirmant ainsi l'efficacité des traitements [5].

### Immunsation des animaux

Des souris de souche Balb/c femelles âgées de 09 semaines fournies par l'institut Pasteur d'Alger, sont utilisées. Sept lots de cinq souris sont constitués. Les animaux sont immunisés par voie intrapéritonéale. Les animaux du lot 1 reçoivent la pSA à 30 µg/ml. Ceux des lots 2, 3 et 4 reçoivent respectivement la solution de *S. aureus* à 10<sup>5</sup> UFC/ml tués par la chaleur ensuite diluée au demi ensuite au quart. Quant aux animaux des lots 5, 6 et 7 ils sont immunisés respectivement par une solution de *S. aureus* à 10<sup>5</sup> UFC/ml, cette même solution est diluée au demi, ensuite au quart. Aussi, 1,25 ml d'adjuvant (complet pour la primo injection et incomplet pour les rappels) sont ajoutés à 1,25 ml de chacune des solutions antigéniques. Une aliquote de 400 µl est injectée à l'animal par voie intrapéritonéale. Le protocole d'immunisation est celui préconisé par Benali [2].

### Détermination des conditions optimales de titrage par E.L.I.S.A.

Notre choix s'est porté sur une variante en deux temps de la méthode E.L.I.S.A. [15]. La première étape consiste à former des complexes antigènes-anticorps entre la pSA et les anticorps de souris et se déroule en phase solide. Dans un second temps, ces complexes seront capturés par des anticorps polyclonaux de lapin anti-pSA adsorbés sur une phase liquide et leur contenu en immunoglobulines de souris sera titré par des anticorps de chèvre anti-Ig de lapin

marqués par la phosphatase alcaline. L'activité enzymatique est mesurée vis-à-vis d'un substrat incolore, le paranitrophénylphosphate (PNPP), que l'hydrolyse transforme en paranitrophénol (PNP) coloré dont l'absorbance à 405 nm sera directement proportionnelle au titre des anticorps.

Les proportions optimales de chacun des réactifs suivants entrant dans le dosage immunoenzymatique sont systématiquement déterminées :

- Anticorps polyclonal de souris anti-pSA,
- Anticorps polyclonal de souris anti-*S. aureus* tués par la chaleur (Sc),
- Anticorps polyclonal de souris anti-*S. aureus* tués par l'hypochlorite de Sodium (Sj),
- Antisérums de lapin anti-pSA commercialisés,
- *S. aureus* tués par la chaleur (Sc),
- *S. aureus* tués par l'hypochlorite de sodium (Sj),
- Conjugué de chèvre anti-Ig de lapin marqué à la phosphatase alcaline.

### Recherche immunoenzymatique et microbiologique de pSA dans le lait

Le test E.L.I.S.A. optimisé est appliqué au dosage de la pSA dans le lait. L'échantillon de lait contaminé par *S. aureus* est fourni par les services du groupe industriel de production de lait (GIPLAIT) de Sidi Bel Abbés. Un deuxième échantillon de lait pasteurisé et conditionné est aussi analysé.

Deux types d'analyses, microbiologique puis immunoenzymatique sont effectuées. La méthode microbiologique consiste en un enrichissement au milieu de Giolitti et Cantoni, un ensemencement et un isolement sur gélose Chapman [9]. Le test à la coagulase et celui à la catalase sont aussi effectués [5].

L'analyse immunoenzymatique nécessite la préparation d'un extrait à partir du lait. Pour minimiser les réactions non spécifiques de l'épreuve, l'extrait d'aliment doit être limpide [1].

Une plaque de microtitration en polystyrène de 96 puits (Nunc) est utilisée. Les puits de A2 à H2, A6 à H6 et A10 à H10 sont doublement représentés par respectivement A1 à H1, A5 à H5 et A9 à H9 et sont utilisés pour la réaction.

Les puits de A4 à E4, A8 à E8 et A12 à E12 sont aussi représentés en double respectivement par A3 à E3, A7 à E7 et A11 à E11 et sont réservés pour les témoins.

Les puits A3, A7 et A11 représentent les positifs contrôles (une solution mère étalon de lait est utilisée).

Les puits B3, B7 et B11 représentent les négatifs contrôles. La solution de lait est remplacée par le tampon de saturation des sites adsorbants PBS-Tween-Gélatine-Polyvinylpyrrolidone (PBS-T-G-PVP) [12].

Les puits C3, C7 et C11 représentent les témoins de l'antisérums de souris (l'antisérums de souris est remplacé par le tampon PBS-T-G-PVP). Les puits D3, D7 et D11 représentent le témoin de l'antisérums de lapin (l'antisérums de lapin est remplacé par le tampon PBS-T-G-PVP). Les puits E3, E7 et E11 représentent le témoin du conjugué (le conjugué est remplacé par le tampon PBS-T-G-PVP). Les puits des colonnes 1, 2, 3 et 4 sont sensibilisés par un antisérums de souris anti-pSA à une dilution de 1/1000<sup>ème</sup>, ceux des colonnes 5, 6, 7 et 8 par un antisérums de souris anti-Sc à 1/4000 et ceux des colonnes 9, 10, 11 et 12 par un polyclonal de souris anti-Sj dilué à 1/2000. Huit dilutions décroissantes de raison 2 (1/2 à 1/256) sont préparées à partir de la solution mère étalon d'extrait de lait en tampon de dilution PBS-T-G-PVP. 100 µl de chaque dilution de la solution antigénique sont introduits dans les puits sensibilisés et représentés en double de A1 (A2) à H1 (H2), A5 (A6) à H5 (H6) et A9 (A10) à H9 (H10).

L'antisérums de lapin anti-pSA est introduit à une dilution de 1/2000<sup>ème</sup> dans les puits des colonnes 1, 2, 3 et 4 et à 1/500 dans les puits des huit colonnes restantes.

La courbe étalon est réalisée par une série de dilution de raison 2 (1/2 à 1/256) à partir d'une solution mère de pSA à 5 µg/ml [13].

Chaque dilution est mise à réagir avec les trois types d'antisérums de souris produits et ensuite avec celui de lapin anti pSA.

## RESULTATS ET DISCUSSION

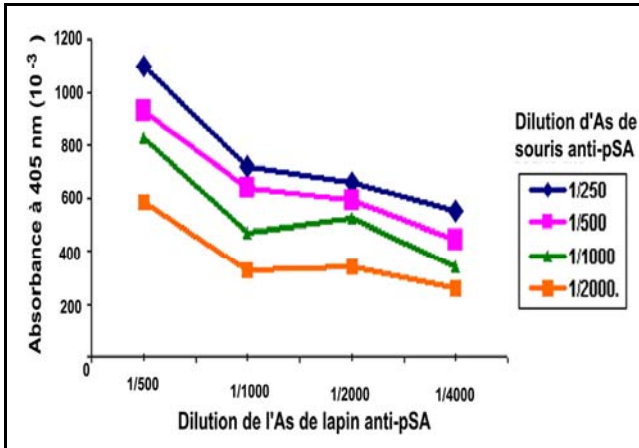
### Détermination des conditions optimales de titrage par E.L.I.S.A.

L'expérimentation est menée sous forme d'une série de tableaux croisés. Les immunoglobulines de lapin sont détectées par une dilution fixée à 1/30 000 d'Ig de chèvre anti-Ig de lapin marquées à la phosphatase alcaline.

La concentration en substrat PNPP est fixée à 1 mg/ml [15]. Par ailleurs le test E.L.I.S.A. adopté donne un coefficient de variation intra-essai ne dépassant pas 6%. Quant à la variation de densité optique, elle n'est significative que si elle est supérieure ou égale au double de celle du témoin sans antigène [6].

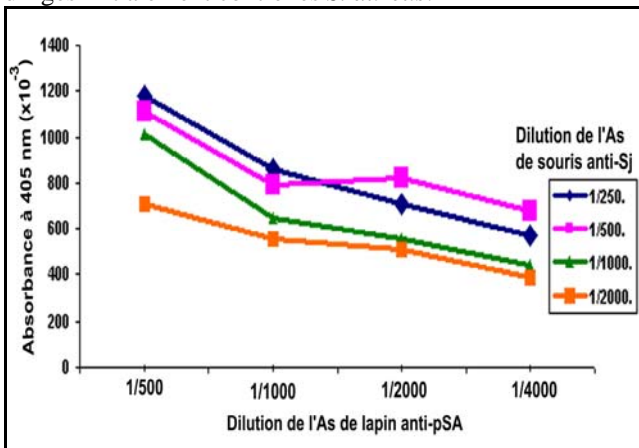
Les antisérums de souris prélevés au 40<sup>ème</sup> et 54<sup>ème</sup> jour d'immunisation dont la concentration en anticorps est importante sont utilisés. Cette étude nous a permis de déterminer les différentes dilutions des réactifs utilisés permettant l'optimisation du test E.L.I.S.A.

La figure 1 montre l'influence du taux de dilution de l'antisérums de souris anti-pSA sur la courbe des densités optiques en fonction des taux de dilutions de l'antisérums de lapin anti-pSA, pour une concentration fixe en pSA de 1,25 µg/ml. Ainsi l'antisérums de souris et de lapin anti-pSA sont respectivement de 1/1000 et 1/2000 à 1,25µg/ml de pSA.

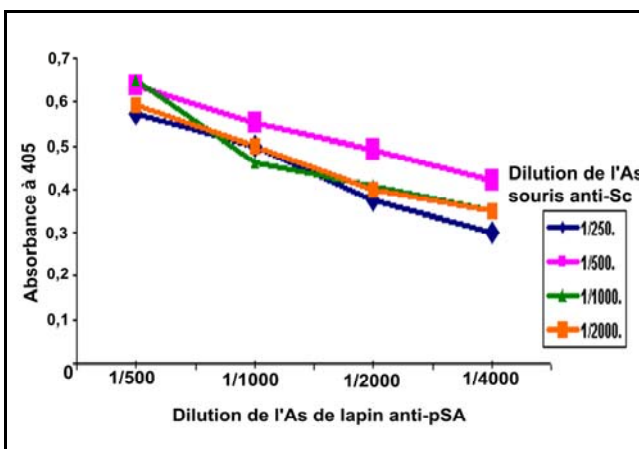


**Figure 1:** Variation de la dilution d'As de souris anti-pSA en fonction de celle de l'As de lapin à 1,25 µg/ml de pSA.

En comparant les différentes dilutions des polyclonaux utilisés, on remarque que la dilution 1/500 du polyclonal de souris anti-*S. aureus* tués soit par l'hypochlorite de Sodium (figure 2) ou par la chaleur (figure 3) et 1/2000 de l'antisérum de lapin anti-pSA sont les dilutions optimales retenues pour le dosage de la pSA par des antisérums dirigés initialement contre les *S. aureus*.



**Figure 2:** Variation de la dilution d'As de souris anti-Sj en fonction de celle de l'As de lapin à 1,25 µg/ml de pSA.



**Figure 3:** Variation de la dilution d'As de souris anti-Sc en fonction de celle de l'As de lapin à de 1,25 µg/ml de pSA.

## IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DE LA PSA DANS LE LAIT

### Analyse microbiologique

#### 1<sup>er</sup> échantillon

L'incubation de l'échantillon de lait de dilution 1/10 à 37°C pendant 24 heures dans le milieu Giolitti Cantoni, noirci. Après isolement sur milieu Chapman, apparaissent des colonies de taille moyenne et élaborant des pigments qui donnent une couleur jaune. Le mélange de la souche avec le plasma de lapin révèle la présence d'un caillot.

Un dégagement gazeux est observé lors du contact de la culture avec l'eau oxygénée confirmant la présence de catalase. L'ensemble de ces tests confirme la contamination du 1<sup>er</sup> échantillon de lait par *S. aureus*.

#### 2<sup>ème</sup> échantillon

Cet échantillon de lait à la dilution 1/10 ne révèle aucun changement après incubation à 37°C pendant 24 heures dans le milieu Giolitti Cantoni, ce qui confirme l'absence de *S. aureus*.

### Analyse immunoenzymatique

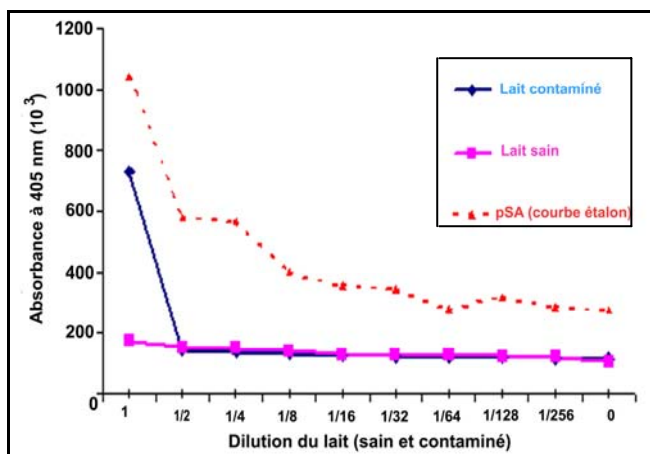
L'utilisation des différents antisérums de souris pour le coating a donné des densités optiques élevées allant de 0,882 (Figure 5) à 1,146 (Figure 6) dans le cas du lait contaminé et des densités optiques faibles allant de 0,174 (Figure 4) à 0,399 (Figure 5) dans le cas du lait sain. Ces résultats corroborent ceux obtenus par la méthode microbiologique.

Le test E.L.I.S.A. permet de rechercher et quantifier la pSA dans les deux échantillons de lait. A cet effet, l'utilisation d'une courbe étalon montre que les densités optiques ne sont pas significatives au-delà de la dilution 1/4.

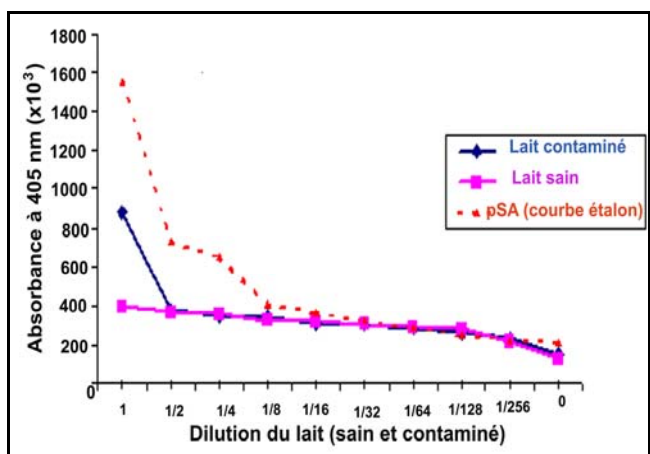
Les figures 4, 5 et 6, montrent que l'échantillon de lait contaminé contient 2,5 à 5µg/ml de pSA. Cette protéine est absente dans le deuxième échantillon. Les densités optiques obtenues lors de l'analyse du 1<sup>er</sup> échantillon de lait contaminé en utilisant les trois types d'antisérum anti-pSA, anti-Sc et anti-Sj ne sont significatives que lorsque l'extrait de lait analysé est utilisé sans dilution.

La figure 4 représente les résultats de l'analyse immunoenzymatique des deux échantillons de lait dans le cas de l'utilisation de l'antisérum de souris anti-pSA pour le coating.

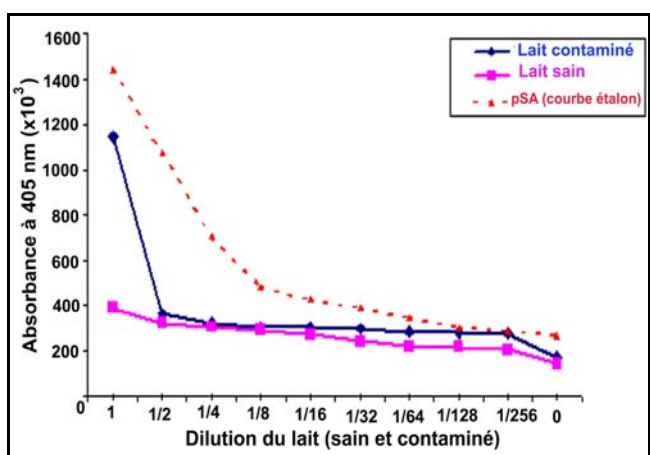
Les résultats montrent que l'antisérum de souris anti-pSA permet de détecter la présence de cette protéine dans l'échantillon de lait déclaré contaminé suite à l'analyse microbiologique.



**Figure 4:** Analyse immunoenzymatique des deux échantillons de lait (sain et contaminé) en utilisant un As de souris anti-pSA pour le coating.



**Figure 5:** Analyse immunoenzymatique des deux échantillons de lait (sain et contaminé) en utilisant un As de souris anti-Sc pour le coating.



**Figure 6:** Analyse immunoenzymatique des deux échantillons de lait (sain et contaminé) en utilisant un As de souris anti-Sj pour le coating.

Avec une absorbance de 0,730 la courbe étalon permet une estimation du taux de cette protéine dans le lait à 3,4 µg/ml. Le même antisérum n'a révélé aucune trace de pSA

dans le 2<sup>ème</sup> échantillon (lait sain) puisque la densité optique reste très faible (0,174).

La figure 5 exprime les résultats de l'analyse immunoenzymatique du lait utilisant un antisérum de souris anti-Sc dans la première étape de sensibilisation. L'utilisation de ce type d'antisérum révèle la présence des *S. aureus* dans le 1<sup>er</sup> échantillon de lait avec une absorbance assez élevée (0,882). L'utilisation de cet antisérum de souris anti-Sc montre l'absence de ces micro-organismes dans le lait et confirme son innocuité (DO = 0,399).

Les résultats de l'analyse immunoenzymatique du lait en utilisant l'antisérum de souris anti-*S. aureus* tués par l'hypochlorite de Sodium pour le coating sont représentés dans la figure 6. Les résultats de l'analyse microbiologique sont confirmés par l'analyse immunoenzymatique puisque l'antisérum de souris anti-Sj décèle la présence des *S. aureus* dans le lait (DO = 1,146) et par conséquent la présence de la pSA. Ce même antisérum ne révèle aucune contamination du 2<sup>ème</sup> échantillon de lait (DO = 0,386).

Les trois types d'antisérums de souris anti-pSA, anti-Sc et Sj utilisés pour le coating permettent tous d'identifier la pSA mais le premier reste l'antisérum de choix.

## CONCLUSION

Les résultats du dosage immunoenzymatique se sont avérés identiques à ceux de l'analyse microbiologique. Les trois types d'antisérums utilisés ont décelé la présence de la pSA dans l'échantillon de lait déclaré contaminé suite à l'analyse microbiologique et ont, ainsi, confirmé sa contamination par *S. aureus*. Par contre les mêmes polyclonaux n'ont décelé aucune trace de pSA dans l'échantillon de lait sain assurant ainsi son innocuité.

L'analyse immunoenzymatique présente un avantage par rapport à l'analyse microbiologique. Elle nous a permis de déterminer le taux de la pSA dans l'échantillon de lait contaminé. En utilisant une courbe étalon de cette protéine nous avons pu estimer sa quantité (3,4 µg/ml). L'antisérum dirigé contre la pSA semble efficace pour la recherche de *S. aureus* dans les aliments.

Le test E.L.I.S.A. optimisé est d'une sensibilité remarquable. La reproductibilité ainsi que la possibilité d'analyse d'un grand nombre d'échantillons à la fois en un temps réduit font de cette méthode immunochimique une méthode de choix capable de remplacer les méthodes microbiologiques classiques actuellement utilisées.

## REFERENCES

- [1]- Akhtar M. Détermination des entérotoxines de *Staphylococcus aureus* dans les aliments et les bouillons de culture. (Méthode d'agglutination passive inversée au latex «APIL»). DGPS, Ottawa, Santé Canada, (1998).

- [2]- Bénali M. Etude de l'hydrolyse de la Béta-caséine bovine par une plasmine immobilisée. Caractérisation immunochimique différentielle d'anticorps monoclonaux dirigés contre cette Caséine et ses produits de dégradation. Thèse de l'université Henri Poincaré-Nancy 1, (1994), pp.87-88.
- [3]- Dacosta Y. Effets comparés des divers modes de conditionnement sur la croissance des bactéries pathogènes responsables des intoxications alimentaires. Ed. Lacosta/Lavoisier, Paris, (1995), pp.110.
- [4]- Derache R. Toxicologie et sécurité des aliments. Ed. Lavoisier, Tec et Doc, Paris, (1989), pp.594.
- [5]- Guiraud J.P. Microbiologie Alimentaire. Ed. DUNOD, Paris, (1998), pp.652.
- [6]- Metenier L., Grosclaude J., Meriaux J.C., 1987. Monoclonal antibodies directed against equine blood group antigens. Dev. Biol. Stand., 57, 77-83.
- [7]- Hernandez F.J., Goyache J., Orden J.A., Blanco J.L., Domenech A., Suarez G., Gomez-Lucia E. Repair and enterotoxin synthesis by *Staphylococcus aureus* after thermal shock. Appl. Environ. Microbiol., 59, (1993), pp.1515-1519.
- [8]- Journal officiel de la république algérienne (JORA). Décret n°57 du 14 septembre 1994.
- [9]- Lebres E., Mouffok F. Guide pratique d'analyses microbiologiques des denrées alimentaires. Service de bactériologie alimentaire, Institut Pasteur, Alger, (1999).
- [10]- Matsushita T, Dinsmore RP, Eberhart RJ, Jones GM, McDonald JS, Sears PM, and Adams DS. Performance studies of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Staphylococcus aureus* antibody in bovine milk. J. Vet. Diag. Invest., (1990), 2, 163-166
- [11]- Organisation mondiale de la santé (OMS). Rapport trimestriel de Statistiques sanitaires mondiales. Vol. 50, Genève, Suisse, (1997).
- [12]- Towbin H., Gordon J. Immunoblotting with monoclonal antibodies. Importance of the blocking solution. Anal. Biochem. 159, (1986), pp.386-389
- [13]- Paraf A., Peltre G. Immuno-analyses pour l'agriculture et l'alimentation. Ed. INRA, Paris, (1992), pp.355.
- [14]- Poutrel B., Sarradin P. Diagnosis of *Staphylococcus aureus* intramammary infections by detecting antibodies in milk with an ELISA kit. Le lait, (1992) 72, n°3 pp 321-325.
- [15]- Ternynck Th., Avrameas S. Techniques immunoenzymatiques. In «Techniques en immunologie» 2<sup>ème</sup> édition, INSERM. S.F.I., Paris, (1991).