

Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux contre l'histamine

Driss SERRAR¹✦, Richard BREBANT², Sylvie BRUNEAU²,
Gerard-Antoine DENOYEL² & Abdelwahab BENAJIBA³

(Reçu le 08/08/1994 ; Accepté le 16/11/1994)

إنتاج و تخصيص لمضادات الأجسام الأحادية اللغات ضد الهستامين

إنتاج مضاد أجسام أحادي اللغة الهستمين ، تم تحصين بعض الفئران بواسطة سبع مزوجات هستمين بروتين وذلك باستعمال عدة بروتينات وعوامل المزوجة. وبعد الانتقاء الأولي ، تم تجميع عناصر الجيل الموالي بمخفف أدنى مزروع بالحن وذلك باستخدام البروتينات الأصلية والمزوجات هستمين كازيين وهستمين البيمين كمضادات الأجنات قصد تشخيص اللغات المفززة لمضادات الأجسام الأحادية اللغات. فقد تم إختيار أربع مضادات أجسام أحادية اللغات وهي (9D9, 7E10, 4D9, 4C9) و درست خصوصياتها. فتفاعلت مضادات الأجسام مع كل المزوجات هستمين بروتين الهيئة وعكس ذلك لم تتفاعل مع البروتينات الأصلية ومع البروتينات المشتقة أو المزوج الشاهد كليسين - كازيين. وبالإضافة لم يلاحظ أي تفاعل متداخل مع الأمينات البيوجينية الست ومع الحامضين الأمينيين القابلين للتداخل في معايرة الهستمين. ونؤهل هذه النتائج أن مكان المستقبل لمضادات أجسامنا يتكون أساسا من جزئية الهستمين المشتقة. وباستعمالنا لهذه المضادات ، وضعنا تقنية مناعة إنزيمية يمكن بها تحديد تركيز الهستمين داخل مختلف عينات السمك وبهذه الطريقة يمكن تحديد تركيز الهستمين داخل مختلف عينات السمك خاصة وبسهولة وبكيفية منتجة نون الاستخلاص عن طريق المذيبات العضوية و نون استعمال النظير المشع.

الكلمات المفتاحية : هستمين - الأمينات البيوجينية - عناصر المزوجة - مضادات الأجسام الأحادية اللغات - ELISA - سمك.

Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux contre l'histamine

Afin de produire un anticorps monoclonal anti-histamine, des souris sont immunisées par 7 conjugués histamine-protéine en utilisant plusieurs protéines et agents de couplage. Après un premier criblage employant les protéines natives et les conjugués histamine-caséine et histamine-BSA comme antigènes pour identifier les clones qui sécrètent des anticorps monoclonaux, les hybridomes sont clonés par dilution limite et cultivés en ascites. Quatre anticorps monoclonaux ont été sélectionnés (4C9, 4D9, 7E10 et 9D9) et leur spécificité a été étudiée. Les anticorps réagissent avec tous les conjugués histamine-protéine préparés. Mais, ils ne réagissent pas avec les protéines natives, les protéines dérivées ou le conjugué témoin glycine-caséine. De plus, aucune réaction croisée n'a été observée avec les 6 amines biogènes et 2 acides aminés susceptibles d'interférer dans le dosage de l'histamine. L'histamine libre non conjuguée inhibe de façon significative la liaison entre les anticorps et le conjugué histamine-caséine. L'histamine libre inhibe moins efficacement les anticorps que le dérivé histamine-benzoquinone et le conjugué histamine-caséine. L'épitope reconnu par ces anticorps semble être constitué essentiellement par la molécule d'histamine dérivée.

Mots clés: Histamine - Amines biogènes - Agents de couplage - Anticorps monoclonaux - Elisa - Poisson

Preparation and characterisation of Monoclonal anti-histamine antibodies

In order to produce monoclonal antibody to histamine, mice are immunized with seven conjugates histamine-protein using several protein and coupling agents. After an initial screening using native protein and histamine-casein, histamine-BSA conjugates as antigens to identify monoclonal antibody secreting clones, the hybridomes are isolated by limiting dilution cloning and grown in ascites. Four antibodies have been selected (4C9, 4D9, 7E10, 9D9) and their specificity has been studied. The antibodies react with all our prepared conjugates histamine-protein. But they are unreactive with native proteins, the derivative proteins, or glycine-casein conjugate. Moreover, no cross-reaction is observed with six biogenic amines and two amino acids that would interfere in the quantitation of histamine. Free unconjugated histamine significantly inhibits antibodies binding to histamine-casein. A much more lower inhibitory potency of free histamine is recorded, as compared to histamine-benzoquinone derivative and to histamine-casein. The main epitope seems encompass the molecule of histamine derived by the coupling agents.

Key words: Histamine - Biogenic amines - Coupling Agents - Monoclonal Antibodies - ELISA - Fish

¹ Université Abdelmalek Essaadi, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Tétouan

² Institut Pasteur, Unité de Bactériologie et de Virologie, Lyon, France

³ Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Laboratoire de Biochimie, Rabat

✦ Auteur correspondant

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, des études statistiques portant sur l'étiologie des intoxications alimentaires, ont fait apparaître une relation entre la consommation de poisson et l'apparition de réactions dites "pseudoallergiques" chez le consommateur. La molécule toxique en cause est l'histamine, dont l'effet peut être renforcé par la présence d'autres amines biogènes (cadavérine, putrescine, spermine, spermidine) dans la chair du poisson.

L'histamine apparaît par décarboxylation de l'histidine, un acide aminé normalement présent à une teneur élevée dans les poissons de la famille des scombridés (thon, maquereau) ou des clupéidés (hareng, sardine). Cette décarboxylation se produit sous l'action de bactéries qui se développent à partir de température supérieure à 15°C dans les ouies et les viscères du poisson.

L'histamine n'est détruite ni par la congélation, ni par l'appertition, ni par le fumage ou le salage. La qualité du produit fini dépend uniquement de celle de la matière première utilisée. Il est donc important de vérifier l'innocuité de celle-ci avant sa transformation. La teneur maximale tolérée en histamine dans les produits de la mer est de 10mg pour 100g en France. L'industriel qui veut s'assurer de la qualité du poisson qu'il reçoit, dispose à l'heure actuelle, essentiellement, des techniques de chromatographie liquide à haute pression (CLHP), considérée comme la méthode de référence, et qui a fait l'objet récemment d'une étude collaborative internationale menée par IPL (Lyon), IFREMER (Nantes), CIVO-TNO (Hollande) et TRS (Ecosse) (Luten *et al.* 1992). Elle est bien maîtrisée mais lente et coûteuse, et s'adapte donc mal au contrôle de routine.

C'est pourquoi on se propose de produire des anticorps monoclonaux contre l'histamine. Dans un premier temps, des conjugués histamine-protéine variés ont été préparés, en utilisant plusieurs agents couplants et protéines. Ces conjugués ont servi à immuniser des souris et à réaliser la fusion. On a obtenu cinq anticorps monoclonaux de souris après dérivation.

L'objet de ce travail est d'étudier les caractéristiques de ces anticorps et de les comparer avec l'anticorps monoclonal D22 produit par Guesdon (1986) et disponible sur le marché.

Abréviations utilisées

BSA	: Bovine Serum Albumine
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
KLH	: Kee-hole Limpet (Hémocyanine de patelle)

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Tampons

- TBS: NaCl 0,15M contenant un tampon Tris-HCl 10mM pH=7,4.
- PBS: tampon phosphate salin 0,01M pH=7,4 contenant 8g de NaCl, 0,2g de KCl, 2,9g de Na₂HPO₄(H₂O)12 et 0,2g de KH₂PO₄.
- PBS-Tween: PBS contenant du Tween 20 (0,1%, v/v).
- Tampon borate-phosphate pH=9 contenant un mélange de 86,8ml de Na₂B₄O₇ (H₂O)10 0,05M et 13,2ml de KH₂PO₄ 0,1M.
- Solution substrat-chromogène:
- *Tampon - phosphate pH=5 , contenant du Na₂HPO₄ 0,2M : 25,7ml, de l'acide citrique 0,1M: 24,3ml, de l'eau distillée : 50ml et 150µl d'H₂O₂ 30%. Juste avant l'utilisation de ce tampon on ajoute l'O-phénylènediamine (OPD) lyophilisée , de manière à avoir une concentration finale en OPD égale à 3mg/ml.

2. Préparation des conjugués amine-protéine

• **Couplage par la benzoquinone.** Ce couplage a été réalisé selon le protocole décrit par Avrameas *et al.* (1978) de la façon suivante: 10mg de BSA (Behring) ou de caséine (Merck, Darmstadt, RFA) sont dissoutes dans 1,7ml de tampon phosphate 0,1M pH=7. À ces solutions on ajoute 0,3ml d'une solution alcoolique de 1,4-benzoquinone (Sigma Chemical Co, Saint-Louis, USA) à 30mg/ml. Le mélange est laissé pendant 1 heure à l'obscurité et à la température du laboratoire puis chromatographié sur une colonne de Trisacryl GF 05 (IBF biotechnics, Villeurbanne-la-Garenne, France) en NaCl 0,15M. La première fraction brune éluée est recueillie et mélangée avec 100mg d'histamine préalablement dissous dans 0,5ml de tampon borate/phosphate pH=9. Le pH est ajusté à 8,5 en ajoutant une solution saturée de borate de sodium. Le mélange est laissé 20 heures à la température du laboratoire puis dialysé contre du TBS à 4°C pendant 24 heures.

La glycine (Merck) est couplée à la caséine en suivant un protocole similaire.

• **Couplage par le Disuccinimidyl Subérate (DSS).** Ce couplage a été réalisé comme pour la benzoquinone sauf que la solution de DSS (Pierce, Rockford, USA) est préparée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration de 60mg/ml (Montesano *et al.*, 1982).

• **Couplage par le 2-iminothiolane-HCl** (réactif de Traut) et le N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) proprionate (SPDP) ou par le réactif de Traut et le Sulfo-succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl-cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC). Dans les deux couplages la fonction amine de l'histamine réagit avec le réactif de traute (Pierce) comme décrit par Blättler *et al.* (1985) pour former le dérivé histamine-réactif de traute. Ce dernier est mis en contact soit avec la protéine modifiée par le SPDP (Pierce), soit avec le Sulfo-SMCC (Pierce) comme décrit respectivement par Carlsson *et al.* (1978) et Hashida *et al.* (1984) pour former les conjugués histamine-protéine. Les conjugués formés sont fixés au fond des plaques de polystyrène pour être détectés en Elisa par un anti-histamine (D22) produit par Guesdon *et al.* (1988).

3. Dérivation des amines

L'histamine, la sérotonine, la tyramine, la cadavérine, la putrescine, la spermine, la spermidine, l'histidine et la glycine (Sigma Chemical Co, Saint-Louis, USA) à 10mg en tampon phosphate 0,1M pH=6, sont traitées soit par la 1,4-benzoquinone (3mg/ml) soit par le SPDP (10mg/ml) ou par le réactif de Traut (4mg/ml) pendant 1 heure à l'obscurité et à la température du laboratoire pour préparer les dérivés "amine-agent de couplage" correspondants. Toutes les amines dérivées ont été conservées à -18°C.

4. Immunisation

Des souris BALB/C (Charles River) mâles âgées de 7 semaines sont immunisées avec les conjugués suivants émulsionnés dans l'adjuvant de Freund:

- 1. BSA-benzoquinone-histamine (BBH)
- 2. KLH-DSS-histamine
- 3. α_1 -glycoprotéine-Sulfo-SMCC-Traut-histamine
- 4. Thyroglobuline-SPDP-Traut-histamine
- 5. Aldolase-Traut-SPDP-histamine
- 6. Thyroglobuline-Sulfo-SMCC-Traut-histamine
- 7. Aldolase-Sulfo-SMCC-Traut-histamine

Les sept immunisations sont effectuées de la façon suivante: la première injection est faite avec l'adjuvant complet, les autres avec l'adjuvant incomplet.

Ces différents conjugués ont été administrés tous les 15 jours par voie sous-cutanée. Seule la dernière immunisation 3 jours avant la fusion a été réalisée par voie intraveineuse. Chaque animal a reçu les différents conjugués, dans l'ordre où ils ont été cités précédemment, à raison de 100 μ g d'histamine par injection.

5. Fusion cellulaire

Trois jours après la dernière immunisation, les rates sont prélevées. La fusion est réalisée en présence de polyéthylène glycol 4000 (Merck) et en utilisant $1,2 \times 10^8$ cellules spléniques et 3×10^7 cellules myélomateuses SP2/oAg8 selon la technique de Köhler & Milstein (1975).

6. Détection des anticorps

Les surnageants de culture d'hybridome sont testés par la technique ELISA en utilisant des plaques de microtitrage (NUNC maxisorp) sensibilisées soit par les conjugués caséine-benzoquinone-histamine (CBH) ou BBH soit par le conjugué témoin caséine-benzoquinone-glycine (CBG). Après sensibilisation (2 heures à 37°C) les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS-Tween. Les surnageants sont dilués au 1/10^{ème} dans du PBS-Tween et ajoutés dans les puits des plaques. Après incubation (2 heures à 37°C), et lavage, le conjugué anti-IgG-peroxydase dilué au 1/5000 est ajouté. Après 30 minutes à température du laboratoire, les plaques sont lavées et la peroxydase liée aux parois des puits est dosée en ajoutant 100 μ l de substrat chromogène en tampon phosphate-citrate pH=5. Après 30 min, la réaction est arrêtée avec 50 μ l de H₂SO₄ 0,5N. Les surnageants contenant des anticorps sont identifiés après mesure de l'absorbance à 492 nm.

7. Détermination des constantes de dissociation (KD)

Les KD sont déterminés en mélangeant des solutions d'antigènes de titres différents avec une solution d'anticorps et incubées à 4°C pendant un temps relativement long (18 h), pour s'assurer d'avoir atteint l'équilibre (Friguet *et al.*, 1985). Ce mélange est alors utilisé sur une plaque ELISA sensibilisée en CBH. Le calcul des KD a été fait selon la formule de Klotz (1971).

8. Détermination de la spécificité des anticorps

Pour étudier les caractéristiques immunologiques des anticorps monoclonaux anti-histamine, les hybridomes intéressants sont clonés et cultivés *in vivo*. La spécificité des anticorps présents dans les liquides d'ascites est analysée par une technique ELISA directe et par un test d'inhibition.

La technique ELISA directe est réalisée en utilisant la méthode décrite ci-dessus pour détecter les anticorps. Les plaques sont alors sensibilisées avec :

- les protéines porteuses utilisées pour l'immunisation: BSA, KLH, α_1 -glycoprotéine,

thyroglobuline et aldolase ;

- les protéines dérivées: caséine-benzoquinone, BSA-benzoquinone, thyroglobuline-Traut, KLH-DSS, aldolase-Sulfo-SMCC et α 1-glycoprotéine-Sulfo-SMCC ;
- les conjugués amine-protéines suivants: CBH, BBH, BSA-DSS-histamine, thyroglobuline-Traut-SPDP-histamine, KLH-DSS-histamine, aldolase-Sulfo-SMCC-Traut-histamine, α 1-glycoprotéine-Sulfo-SMCC-Traut-histamine et caséine-benzoquinone-glycine (CBG).

Les tests d'inhibition sont réalisés en mélangeant 10 ng environ d'anticorps monoclonal avec des quantités variables des différents inhibiteurs. Les mélanges sont incubés pendant 2 heures à 37°C, puis les anticorps restants libres sont dosés en utilisant le conjugué anti-IgG-peroxydase et une microplaque sensibilisée par la CBH.

9. Détermination des isotypes

La détermination des sous-types (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 et IgM) des anticorps a été identifiée selon un protocole et un Kit fourni par Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN).

10. Purification des anticorps monoclonaux

La méthode de purification des anticorps a été décrite par Bruck *et al.* (1972): les ascites sont précipitées en sulfate d'ammonium à demi-saturation. Après centrifugation 20 min à 4000 rpm, le précipité obtenu est remis en solution dans un tampon Tris-HCl 0,025M pH=8,8 NaCl 0,020M puis dialysé une nuit contre le même tampon.

La solution dialysée est chromatographiée sur une colonne de DEAE-trisacryl (IBF) sur laquelle on applique 3 tampons successifs:

- Tris-HCl 0,025M pH=8,8 NaCl 0,025M
- Tris-HCl 0,025M pH=8,8 NaCl 0,090M
- Tris-HCl 0,025M pH=8,8 NaCl 1M

Les fractions de 5ml sont recueillies, dialysées puis lyophilisées.

11. Test d'additivité

Les anticorps sont comparés deux à deux. Le test utilisé est celui du test ELISA décrit ci-dessus. Le revêtement est réalisé avec le conjugué CBH. Les échantillons à tester sont constitués, d'une part, par chaque anticorps du couple dilué de façon à obtenir une absorbance (DO) comprise entre 0,8 et 1,2 et, d'autre part, le mélange à parties égales de ces deux anticorps monoclonaux ainsi dilués. Le calcul de l'indice d'additivité (I.A.) se fait à partir

des absorbances obtenues et selon la formule de Friguet *et al.* (1983):

$$I.A. = \left\{ \left[\frac{2A_{1+2}}{A_1 + A_2} \right] - 1 \right\} \times 100$$

A₁ = absorbance maximale obtenue par une quantité d'un anticorps seul sur un seul revêtement

A₂ = absorbance maximale obtenue par une quantité d'un deuxième anticorps seul sur le même revêtement

A₁₊₂ = absorbance obtenue par le mélange de 2 anticorps A₁ et A₂ sur le même revêtement

Si les 2 anticorps reconnaissent le même site (c'est-à-dire, ils ont la même spécificité) A₁₊₂ doit être égale à la valeur moyenne de A₁+A₂ et I.A.=0.

Si au contraire, les 2 anticorps reconnaissent des sites différents, A₁₊₂ doit être égale à la somme de A₁+A₂ et I.A doit être égale à 100%.

12. Test de compétition

Les anticorps sont également comparés 2 à 2, mais dans ce test l'un des 2 anticorps est marqué par la biotine. Le principe de base est de permettre à un anticorps de réagir avec un conjugué histamine-protéine immobilisé au fond de plaque, puis de mesurer l'inhibition de la liaison d'un deuxième anticorps vis-à-vis du même conjugué. L'inhibition compétitive du deuxième anticorps en jeu est dirigée contre le même épitope (Lubeck & Gerhard, 1981).

13. Dosage immunoenzymatique de l'histamine dans le poisson

• **Préparation des extraits de poisson.** Deux grammes de chair de poisson sont homogénéisés dans de l'eau distillée (q.s.p. 10ml) avec un Ultraturrax (Junke & Kunke). La suspension obtenue est centrifugée à 6000 rpm pendant 20 minutes. Les surnageants sont prélevés et filtrés sur membrane (0,45µm).

• **Technique de dosage par ELISA d'inhibition.** Le dosage repose ici sur l'inhibition de la fixation de l'anticorps anti-histamine sur le conjugué CBH déposé au fond de plaque, par l'histamine. La solution d'histamine à doser, après modification par la 1,4-benzoquinone, est incubée en présence d'une quantité connue d'anticorps monoclonal reconnaissant l'histamine modifiée par la benzoquinone. Ce mélange est ensuite déposé sur une plaque sensibilisée avec de l'histamine couplée à la caséine par la benzoquinone. Les anticorps n'ayant pas réagi avec l'histamine libre vont alors se lier à l'histamine immobilisée sur le

• **Couplage par le 2-iminothiolane-HCl** (réactif de Traut) et le **N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) proprionate (SPDP)** ou par le réactif de Traut et le **Sulfo-succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl-cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC))**. Dans les deux couplages la fonction amine de l'histamine réagit avec le réactif de traute (Pierce) comme décrit par Blättler *et al.* (1985) pour former le dérivé histamine-réactif de traute. Ce dernier est mis en contact soit avec la protéine modifiée par le SPDP (Pierce), soit avec le Sulfo-SMCC (Pierce) comme décrit respectivement par Carlsson *et al.* (1978) et Hashida *et al.* (1984) pour former les conjugués histamine-protéine. Les conjugués formés sont fixés au fond des plaques de polystyrène pour être détectés en Elisa par un anti-histamine (D22) produit par Guesdon *et al.* (1988).

3. Dérivation des amines

L'histamine, la sérotonine, la tyramine, la cadavérine, la putrescine, la spermine, la spermidine, l'histidine et la glycine (Sigma Chemical Co, Saint-Louis, USA) à 10mg en tampon phosphate 0,1M pH=6, sont traitées soit par la 1,4-benzoquinone (3mg/ml) soit par le SPDP (10mg/ml) ou par le réactif de Traut (4mg/ml) pendant 1 heure à l'obscurité et à la température du laboratoire pour préparer les dérivés "amine-agent de couplage" correspondants. Toutes les amines dérivées ont été conservées à -18°C.

4. Immunisation

Des souris BALB/C (Charles River) mâles âgées de 7 semaines sont immunisées avec les conjugués suivants émulsionnés dans l'adjuvant de Freund:

- 1. BSA-benzoquinone-histamine (BBH)
- 2. KLH-DSS-histamine
- 3. α 1-glycoprotéine-Sulfo-SMCC-Traut-histamine
- 4. Thyroglobuline-SPDP-Traut-histamine
- 5. Aldolase-Traut-SPDP-histamine
- 6. Thyroglobuline-Sulfo-SMCC-Traut-histamine
- 7. Aldolase-Sulfo-SMCC-Traut-histamine

Les sept immunisations sont effectuées de la façon suivante: la première injection est faite avec l'adjuvant complet, les autres avec l'adjuvant incomplet.

Ces différents conjugués ont été administrés tous les 15 jours par voie sous-cutanée. Seule la dernière immunisation 3 jours avant la fusion a été réalisée par voie intraveineuse. Chaque animal a reçu les différents conjugués, dans l'ordre où ils ont été cités précédemment, à raison de 100 μ g d'histamine par injection.

5. Fusion cellulaire

Trois jours après la dernière immunisation, les rates sont prélevées. La fusion est réalisée en présence de polyéthylène glycol 4000 (Merck) et en utilisant $1,2 \times 10^8$ cellules spléniques et 3×10^7 cellules myélomateuses SP2/oAg8 selon la technique de Köhler & Milstein (1975).

6. Détection des anticorps

Les surnageants de culture d'hybridome sont testés par la technique ELISA en utilisant des plaques de microtitrage (NUNC maxisorp) sensibilisées soit par les conjugués caséine-benzoquinone-histamine (CBH) ou BBH soit par le conjugué témoin caséine-benzoquinone-glycine (CBG). Après sensibilisation (2 heures à 37°C) les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS-Tween. Les surnageants sont dilués au 1/10^{ème} dans du PBS-Tween et ajoutés dans les puits des plaques. Après incubation (2 heures à 37°C), et lavage, le conjugué anti-IgG-peroxydase dilué au 1/5000 est ajouté. Après 30 minutes à température du laboratoire, les plaques sont lavées et la peroxydase liée aux parois des puits est dosée en ajoutant 100 μ l de substrat chromogène en tampon phosphate-citrate pH=5. Après 30 min, la réaction est arrêtée avec 50 μ l de H₂SO₄ 0,5N. Les surnageants contenant des anticorps sont identifiés après mesure de l'absorbance à 492 nm.

7. Détermination des constantes de dissociation (KD)

Les KD sont déterminés en mélangeant des solutions d'antigènes de titres différents avec une solution d'anticorps et incubées à 4°C pendant un temps relativement long (18 h), pour s'assurer d'avoir atteint l'équilibre (Friguet *et al.*, 1985). Ce mélange est alors utilisé sur une plaque ELISA sensibilisée en CBH. Le calcul des KD a été fait selon la formule de Klotz (1971).

8. Détermination de la spécificité des anticorps

Pour étudier les caractéristiques immunologiques des anticorps monoclonaux anti-histamine, les hybridomes intéressants sont clonés et cultivés *in vivo*. La spécificité des anticorps présents dans les liquides d'ascites est analysée par une technique ELISA directe et par un test d'inhibition.

La technique ELISA directe est réalisée en utilisant la méthode décrite ci-dessus pour détecter les anticorps. Les plaques sont alors sensibilisées avec :

- les protéines porteuses utilisées pour l'immunisation: BSA, KLH, α 1-glycoprotéine,

thyroglobuline et aldolase ;

- les protéines dérivées: caséine-benzoquinone, BSA-benzoquinone, thyroglobuline-Traut, KLH-DSS, aldolase-Sulfo-SMCC et α 1-glycoprotéine-Sulfo-SMCC ;
- les conjugués amine-protéines suivants: CBH, BBH, BSA-DSS-histamine, thyroglobuline-Traut-SPDP-histamine, KLH-DSS-histamine, aldolase-Sulfo-SMCC-Traut-histamine, α 1-glycoprotéine-Sulfo-SMCC-Traut-histamine et caséine-benzoquinone-glycine (CBG).

Les tests d'inhibition sont réalisés en mélangeant 10 ng environ d'anticorps monoclonal avec des quantités variables des différents inhibiteurs. Les mélanges sont incubés pendant 2 heures à 37°C, puis les anticorps restants libres sont dosés en utilisant le conjugué anti-IgG-peroxydase et une microplaque sensibilisée par la CBH.

9. Détermination des isotypes

La détermination des sous-types (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 et IgM) des anticorps a été identifiée selon un protocole et un Kit fourni par Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN).

10. Purification des anticorps monoclonaux

La méthode de purification des anticorps a été décrite par Bruck *et al.* (1972): les ascites sont précipitées en sulfate d'ammonium à demi-saturation. Après centrifugation 20 min à 4000 rpm, le précipité obtenu est remis en solution dans un tampon Tris-HCl 0,025M pH=8,8 NaCl 0,020M puis dialysé une nuit contre le même tampon.

La solution dialysée est chromatographiée sur une colonne de DEAE-trisacryl (IBF) sur laquelle on applique 3 tampons successifs:

- Tris-HCl 0,025M pH=8,8 NaCl 0,025M
- Tris-HCl 0,025M pH=8,8 NaCl 0,090M
- Tris-HCl 0,025M pH=8,8 NaCl 1M

Les fractions de 5ml sont recueillies, dialysées puis lyophilisées.

11. Test d'additivité

Les anticorps sont comparés deux à deux. Le test utilisé est celui du test ELISA décrit ci-dessus. Le revêtement est réalisé avec le conjugué CBH. Les échantillons à tester sont constitués, d'une part, par chaque anticorps du couple dilué de façon à obtenir une absorbance (DO) comprise entre 0,8 et 1,2 et, d'autre part, le mélange à parties égales de ces deux anticorps monoclonaux ainsi dilués. Le calcul de l'indice d'additivité (I.A.) se fait à partir

des absorbances obtenues et selon la formule de Friguet *et al.* (1983):

$$I.A. = \left\{ \left[\frac{2A_{1+2}}{A_1 + A_2} \right] - 1 \right\} \times 100$$

A_1 = absorbance maximale obtenue par une quantité d'un anticorps seul sur un seul revêtement

A_2 = absorbance maximale obtenue par une quantité d'un deuxième anticorps seul sur le même revêtement

A_{1+2} = absorbance obtenue par le mélange de 2 anticorps A_1 et A_2 sur le même revêtement

Si les 2 anticorps reconnaissent le même site (c'est-à-dire, ils ont la même spécificité) A_{1+2} doit être égale à la valeur moyenne de A_1+A_2 et I.A.=0.

Si au contraire, les 2 anticorps reconnaissent des sites différents, A_{1+2} doit être égale à la somme de A_1+A_2 et I.A doit être égale à 100%.

12. Test de compétition

Les anticorps sont également comparés 2 à 2, mais dans ce test l'un des 2 anticorps est marqué par la biotine. Le principe de base est de permettre à un anticorps de réagir avec un conjugué histamine-protéine immobilisé au fond de plaque, puis de mesurer l'inhibition de la liaison d'un deuxième anticorps vis-à-vis du même conjugué. L'inhibition compétitive du deuxième anticorps en jeu est dirigée contre le même épitope (Lubeck & Gerhard, 1981).

13. Dosage immunoenzymatique de l'histamine dans le poisson

• **Préparation des extraits de poisson.** Deux grammes de chair de poisson sont homogénéisés dans de l'eau distillée (q.s.p. 10ml) avec un Ultraturrax (Junke & Kunke). La suspension obtenue est centrifugée à 6000 rpm pendant 20 minutes. Les surnageants sont prélevés et filtrés sur membrane (0,45 μ m).

• **Technique de dosage par ELISA d'inhibition.** Le dosage repose ici sur l'inhibition de la fixation de l'anticorps anti-histamine sur le conjugué CBH déposé au fond de plaque, par l'histamine. La solution d'histamine à doser, après modification par la 1,4-benzoquinone, est incubée en présence d'une quantité connue d'anticorps monoclonal reconnaissant l'histamine modifiée par la benzoquinone. Ce mélange est ensuite déposé sur une plaque sensibilisée avec de l'histamine couplée à la caséine par la benzoquinone. Les anticorps n'ayant pas réagi avec l'histamine libre vont alors se lier à l'histamine immobilisée sur le

support. La plaque est rincée, puis les anticorps sont révélés par un conjugué anti-IgG de souris marqué à la peroxydase. Après un nouveau rinçage, l'activité de la peroxydase liée est révélée en déposant 100µl de la solution substrat-chromogène. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la réaction enzymatique est arrêtée par inactivation de l'enzyme en ajoutant 50µl de H₂SO₄ 0,5N. L'absorbance, lue à 492 nm, est proportionnelle à la quantité d'anticorps monoclonal anti-histamine ayant réagi avec l'histamine immobilisée au fond de plaque, et donc inversement proportionnelle à la quantité d'histamine présente dans l'échantillon à doser.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Réalisation des conjugués

Pour obtenir des anticorps anti-haptène, il est nécessaire de coupler l'haptène (ici l'histamine PM=111) à une protéine porteuse, par exemple la BSA, en utilisant une méthode qui permet d'avoir une densité optimale d'épitopes. En effet, il est connu qu'un antigène qui possède une faible densité d'épitopes (moins de 5 molécules d'haptène/molécule de BSA) est peu efficace pour induire la production d'anticorps. De plus, un antigène trop fortement substitué (plus de 50 molécules d'haptène/molécule de BSA) favorise la production d'anticorps appartenant à la classe des IgM.

On a essayé différentes techniques pour préparer les immunogènes histamine-protéine. La méthode utilisant la 1,4-benzoquinone (Avrameas *et al.*, 1978) permet d'obtenir un taux de substitution compatible avec les critères exigés.

Les autres conjugués histamine-protéine sont préparés soit avec des agents de couplage hétérobifonctionnels (SPDP et Sulfo-SMCC), soit avec des agents de couplage homobifonctionnels (DSS et réactif de Traut). Tous ces conjugués produits sont détectés avec l'anticorps monoclonal D22, par la méthode ELISA décrite précédemment. Ces conjugués ont été obtenus par dérivation de l'histamine au niveau de sa fonction amine libre selon plusieurs auteurs (Morel & Delaage, 1988; Guesdon *et al.*, 1988; Peyret *et al.*, 1986). D'autres auteurs, par contre, ont choisi un des azotes du cycle imidazole pour dériver l'histamine (Mita *et al.*, 1984; Hammar *et al.*, 1985). Les anticorps obtenus par Hammar *et al.* (1985) reconnaissent également la méthyl-histamine.

2. Contrôle des immunisations

L'augmentation du titre en anticorps a été évaluée par le calcul de la différence d'absorbance entre les conjugués CBH ou BBH et le conjugué témoin CBG. La montée des anticorps a été obtenue après la quatrième immunisation et s'est poursuivie jusqu'à la septième immunisation où un plateau a été observé (Figure 1). À ce stade, les souris présentant le titre le plus élevé en anticorps ont été sacrifiées et leurs rates prélevées.

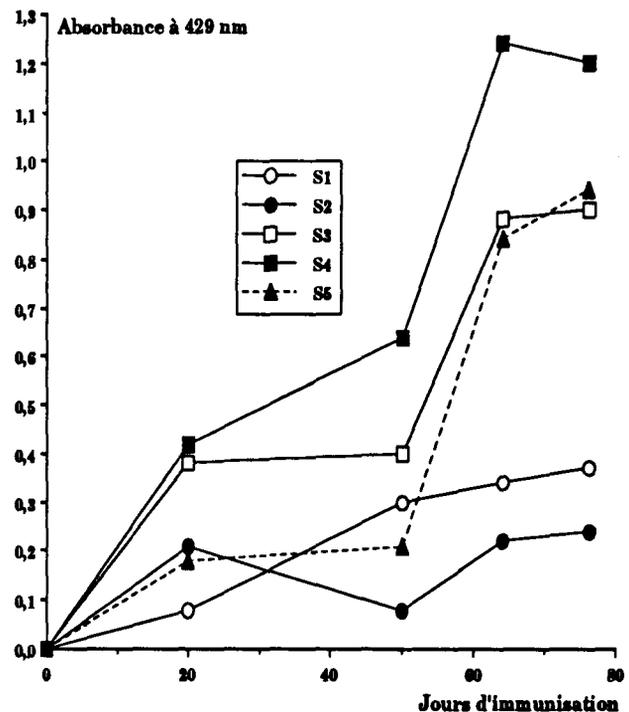


Figure 1. Évolution du titre en anticorps anti-Histamine chez 5 souris (S1, S2, S3, S4, S5) immunisées avec 7 conjugués histamine-protéines (voir § 4 Matériels & Méthodes)

3. Sélection des anticorps

Après la fusion cellulaire, plus de mille surnageants de culture d'hybridome ont été testés par ELISA ; dix anticorps reconnaissant les conjugués histamine-protéine ont été obtenus. Cinq anticorps seulement reconnaissent les conjugués histamine-protéine et ne reconnaissent pas les protéines natives ou dérivées (7E8, 4C9, 7E10, 9D9 et 4D9) (Tableau 1). Seulement 4 de ces anticorps monoclonaux (4C9, 7E10, 9D9 et 4D9) ont pu être purifiés en quantité suffisante. Ce sont tous des IgG. Ils possèdent tous une chaîne légère Kappa. Les hybridomes correspondant ont été clonés et cultivés *in vivo* pour obtenir de grandes quantités d'anticorps. L'anticorps monoclonal 7E8, une IgM, n'a pas pu être purifié en quantité

suffisante et n'a donc pas été utilisé par la suite. L'intégration des gels après électrophorèse montre que le 4C9 a été purifié à 98% et le 9D9 à 96%. Le 7E10 et le 4D9 l'ont été à 75%.

4. Détermination des constantes de dissociation

Les constantes de dissociation (KD) des anticorps monoclonaux ont été réalisées selon la méthode ELISA décrite par Friguet *et al.* (1985). Elles ont été calculées pour 3 antigènes différents: CBH, histamine-benzoquinone et histamine native. Le tableau 2 résume les constantes de dissociation pour chacun des anticorps et les concentrations de ces mêmes antigènes requises pour obtenir 50% d'inhibition.

5. Spécificité des anticorps monoclonaux

La spécificité des quatre anticorps retenus est analysée par une technique ELISA directe et un test ELISA d'inhibition.

• **Technique Elisa directe.** Les quatre anticorps reconnaissent les différents conjugués histamine-agent de couplage-porteur préparés par les agents de couplage suivants: benzoquinone, réactif de Traut, SPDP, DSS et Sulfo-SMCC. De plus, ces anticorps ne reconnaissent pas les protéines natives ou dérivées par ces mêmes agents de couplage et ne se fixent pas sur le conjugué témoin CBG (Tableau 1).

• **Test Elisa d'inhibition.** L'addition de quantités croissantes d'histamine libre, d'histamine dérivée ou d'histamine couplée par la benzoquinone à la caséine ou à la BSA, aux différents anticorps a permis de déterminer pour chaque anticorps des courbes d'inhibition (Figure 2: A, B, C, D, E, F).

Les résultats obtenus montrent que la fixation des anticorps sur une plaque sensibilisée par le conjugué CBH est totalement inhibée par les conjugués CBH et BBH à une concentration

Tableau 1. Détection et caractérisation des anticorps monoclonaux anti-Histamine

+ : La différence d'absorbances entre porteur-agent couplant-Histamine et porteur (BSA, thyroglobuline, KLH, aldolase, α_1 -glycoprotéine) ou porteur-agent couplant (BSA-benzoquinone, thyroglobuline-traut, aldolase-Sulfo-SMCC, KLH-DSS, α_1 -glycoprotéine-Sulfo-SMCC) est supérieure à 300
 - : La différence est inférieure à 300
 * : Anticorps monoclonal produit par J.L. Guesdon (Institut Pasteur de Paris)

Antigènes	Anticorps monoclonaux					
	D22 *	7E8	4C9	7E10	9D9	4D9
	IgG1	IgM	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Caséine-benzoquinone-Histamine	+	+	+	+	+	+
BSA-benzoquinone-Histamine	+	+	+	+	+	+
BSA-DSS-Histamine	+	-	+	+	+	+
KLH-DSS-Histamine	+	-	+	+	+	+
Aldolase-Sulfo-SMCC-Traut-Histamine	+	+	+	+	+	+
Thyroglobuline-Traut-SPDP-Histamine	+	+	+	+	+	+
α_1 -glycoprotéine-Sulfo-SMCC-Traut-Histamine	+	+	+	+	+	+
Caséine-benzoquinone-Glycine	-	-	-	-	-	-

Tableau 2. Détermination des constantes de dissociation et 50% d'inhibition de la fixation des anticorps (4C9, 4D9, 9S9, 7E10) sur le conjugué Caséine-Benzoquinone-Histamine par différentes molécules (Caséine-Benzoquinone-Histamine, Histamine-Benzoquinone, Histamine native)

Inhibiteur4 C 9.....	4 D 9.....	9 D 9.....	7 E 10.....	
	C.I.*	KD (M)	C.I.*	KD (M)	C.I.*	KD (M)	C.I.*	KD (M)
Caséine-Benzoquinone- Histamine	1.10 ⁻⁷	7. 10 ⁻⁹	2,5.10 ⁻⁷	1,7.10 ⁻⁸	3.10 ⁻⁸	2. 10 ⁻⁹	5.10 ⁻⁸	3,4.10 ⁻⁹
Histamine-Benzoquinone	2.10 ⁻⁷	7,5.10 ⁻⁹	1. 10 ⁻⁶	7. 10 ⁻⁸	2.10 ⁻⁸	3,4.10 ⁻⁸	5.10 ⁻⁸	3,5.10 ⁻⁸
Histamine native	5.10 ⁻³	3,5.10 ⁻⁴	1. 10 ⁻³	1,5.10 ⁻⁴	1.10 ⁻⁴	4,8.10 ⁻⁴	8.10 ⁻³	5,7.10 ⁻⁴

* Concentration(M) provoquant 50% d'inhibition

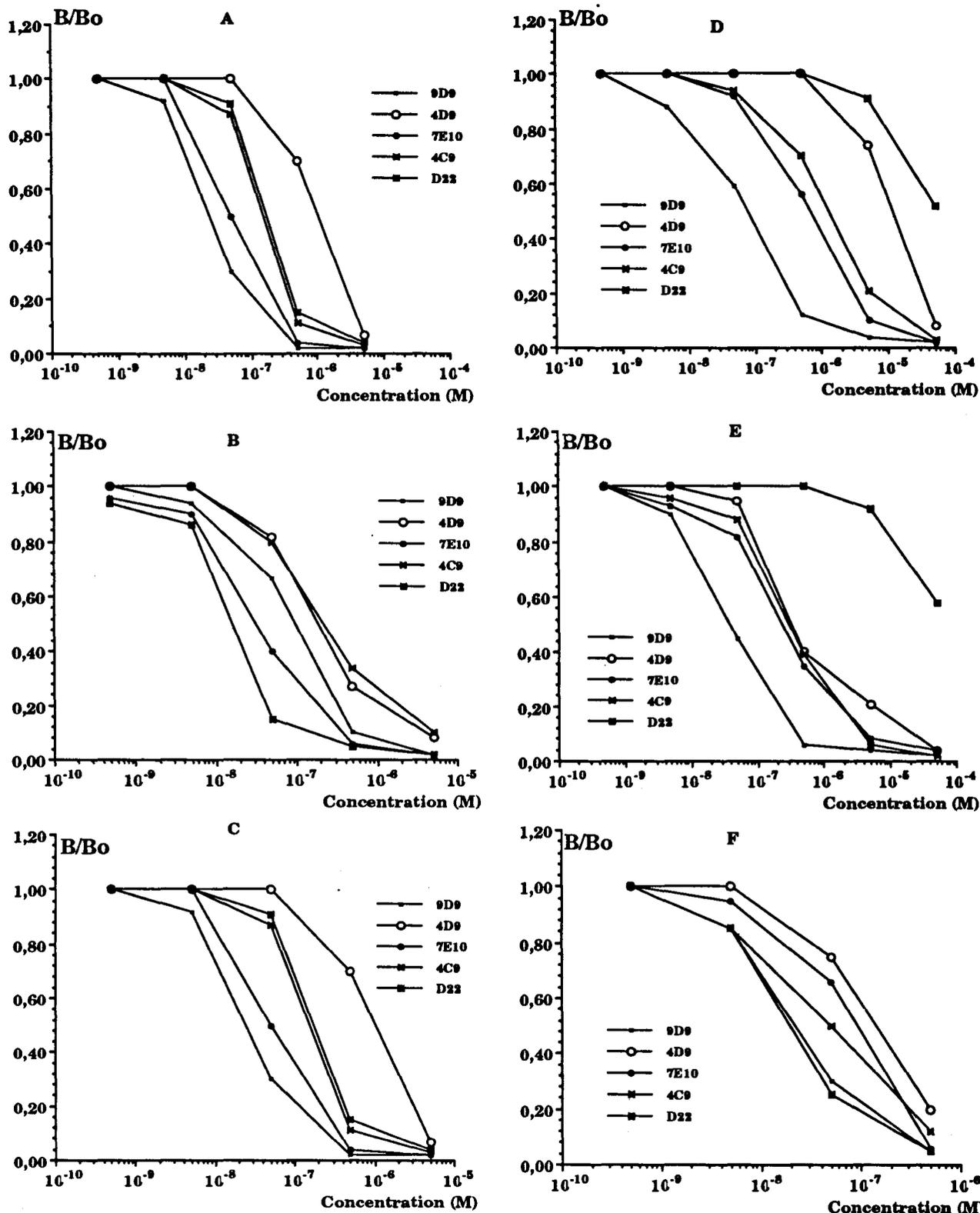


Figure 2. Courbes d'inhibition des anticorps monoclonaux anti-Histamine (9D9, 4D9, 7E10, 4C9 et D22) par les conjugués A= Caséine-Benzoquinone-Histamine ; B= BSA-Benzoquinone-Histamine-Histamine ; C= Histamine-Benzoquinone ; D= Histamine-SPDP; E= Histamine-Traut ; F= Histamine native, en ELISA

Les concentrations sont exprimées en moles d'histamine

B représente la quantité d'anticorps monoclonal liée en présence de l'antigène et B_0 la quantité de ce même anticorps liée en absence de l'antigène

correspondant à 5×10^{-6} M, par le dérivé histamine-benzoquinone à 5×10^{-6} M et par l'histamine libre à 5×10^{-2} M.

Pour les dérivés histamine-SPDP et histamine-Traut, l'inhibition totale de nos anticorps est provoquée par une concentration de 5×10^{-5} M. La même concentration de ces deux dérivés entraîne des inhibitions de 48 et 42% respectivement pour le D22.

Au contraire, et sur le même coating, on n'a pas observé d'inhibition significative avec les 6 amines

biogènes (sérotonine, putrescine, tyramine, cadavérine, spermine et spermidine) et 2 acides aminés (histidine et glycine) seuls ou dérivés avec les 3 agents de couplage (benzoquinone, SPDP et réactif de Traut) (Tableau 3).

6. Étude épitopique

Les résultats obtenus (Tableau 4) montrent que les indices d'additivité de la comparaison du D22 et des autres anticorps monoclonaux sont compris entre 65 et 75%, sur un coating CBH.

Tableau 3. Inhibition de la fixation des anticorps 9D9, 4D9, 7E10, 4C9 et D22 sur le conjugué Caséine-Benzoquinone-Histamine par différentes molécules

Inhibiteur	Concentration (M)	Inhibition (%).....				
		9D9	4D9	7E10	4C9	D22
Histidine	5.10^{-3}	0	0	0	0	0
Histidine-benzoquinone	5.10^{-6}	0	0	0	0	0
Histidine-SPDP	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Histidine-Traut	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Sérotonine	5.10^{-3}	5	0	0	0	4
Sérotonine-benzoquinone	5.10^{-6}	5	5	0	0	3
Sérotonine-SPDP	5.10^{-5}	4	0	0	0	0
Sérotonine-Traut	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Tyramine	5.10^{-3}	0	0	0	10	0
Tyramine-benzoquinone	5.10^{-6}	0	0	5	0	0
Tyramine-SPDP	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Tyramine-Traut	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Cadavérine	5.10^{-3}	0	0	0	0	0
Cadavérine-benzoquinone	5.10^{-6}	6	0	5	0	3
Cadavérine-SPDP	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Cadavérine-Traut	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Putrescine	5.10^{-3}	0	0	0	0	0
Putrescine-benzoquinone	5.10^{-6}	8	10	8	6	6
Putrescine-SPDP	5.10^{-5}	4	0	0	0	0
Putrescine-Traut	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Spermine	5.10^{-3}	0	0	0	0	0
Spermine-benzoquinone	5.10^{-6}	0	10	0	4	0
Spermine-SPDP	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Spermine-Traut	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Spermidine	5.10^{-3}	0	0	0	0	0
Spermidine-benzoquinone	5.10^{-6}	0	6	0	5	0
Spermidine-SPDP	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Spermidine-Traut	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Glycine	5.10^{-3}	0	0	0	0	0
Glycine-benzoquinone	5.10^{-6}	0	0	0	0	0
Glycine-SPDP	5.10^{-5}	0	0	0	0	0
Glycine-Traut	5.10^{-5}	0	0	0	0	0

Tableau 4. Résultats des tests d'additivité pour 5 anticorps monoclonaux anti-Histamine, avec comme antigène le conjugué Caséine-Benzoinquinone-Histamine
Pour chaque paire d'anticorps l'indice d'additivité est exprimé en pourcentage

Anticorps	D22	4C9	7E10	9D9	4D9
D22	-	68	75	65	69
4C9	68	-	41	35	30
7E10	75	41	-	47	54
9D9	65	35	47	-	25
4D9	69	30	54	25	-

Ces indices sont plus faibles si on compare les anticorps que nous avons produits entre eux (entre 25 et 54%). Les épitopes reconnus par nos anticorps et le D22 semblent donc différents à 70% environ.

Ces résultats sont confirmés par les tests de compétition (Figure 3) qui montrent que ces anticorps rentrent faiblement en compétition avec le D22 (entre 10 et 30% selon l'anticorps).

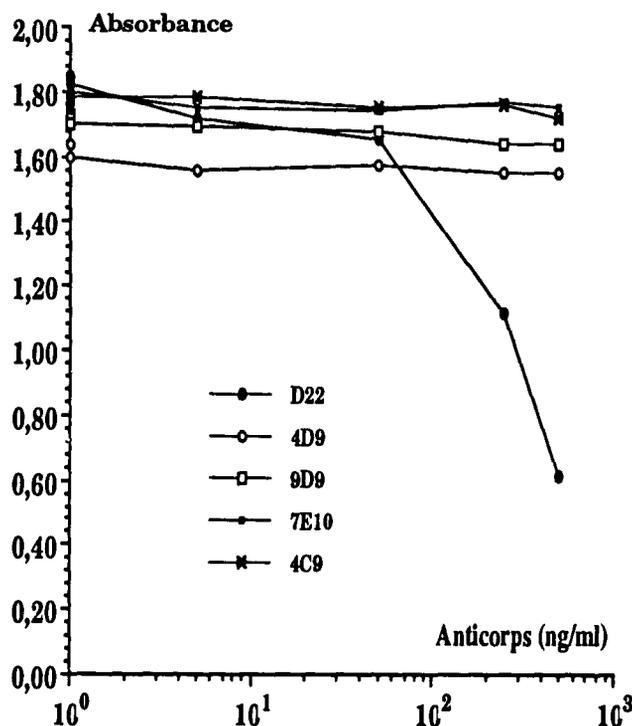


Figure 3. Comparaison des anticorps monoclonaux anti-Histamine par le test de compétition
La comparaison a été réalisée pour chaque anticorps monoclonal (4C9, 7E10, 9D9, 4C9, D22) avec le D22 marqué par la biotine. L'absorbance est portée en fonction du logarithme de la concentration de l'anticorps en ng/ml

7. Dosage de l'histamine dans le poisson

La technique ELISA de dosage de l'histamine, décrite ici, tient compte de la spécificité fine des anticorps monoclonaux ; elle comporte les étapes suivantes: modification de l'histamine par la 1,4-benzoquinone, incubation du dérivé histamine-benzoquinone avec une quantité connue d'anticorps monoclonal, incubation de ce mélange dans les puits d'une plaque sensibilisée par le conjugué CBH, addition du conjugué anti-IgG de souris marqué à la peroxydase, lavage de la plaque et détermination de l'activité enzymatique.

Dans les conditions optimales, cette technique permet de doser l'histamine entre 10 et 50ng/ml. Une concentration en histamine supérieure à 50 ng/ml entraîne une inhibition trop importante pour pouvoir être déterminée avec précision.

La présente technique a été comparée avec la technique CLHP pour déterminer le taux d'histamine dans différents échantillons de poisson. Dans les deux cas il existe une corrélation positive. Par exemple, dans le cas de 4C9, l'étude comparative portant sur 43 échantillons de poisson différents a donné un coefficient de corrélation $r = 0,998$ ($p < 0,001$) avec une droite de régression $y = 1,01 + 5,69$ (Serrar *et al.*, 1994).

CONCLUSION

Les conséquences physiopathologiques de la présence de l'histamine dans les aliments ont conduit les services de contrôles à rechercher des méthodes de détection simples, rapides et fiables, permettant d'éliminer rapidement les denrées suspectes.

De nombreuses méthodes d'identification et de dosage de l'histamine dans les denrées alimentaires existent déjà, mais ne sont pas totalement satisfaisantes, en raison soit d'un manque de sensibilité, soit de la difficulté de leur mise en oeuvre, soit encore des interférences avec d'autres amines biogènes apparaissant simultanément au cours de l'altération des aliments.

Le dosage immunoenzymatique de l'histamine apporte une solution particulièrement intéressante et bien adaptée à ces problèmes.

Dans ce but, on a produit des anticorps anti-histamine. Leur spécificité vis-à-vis des amines biogènes susceptibles d'être associées à l'histamine dans les conserves de poisson altérées a été étudiée.

Aucune réaction croisée n'a été observée. En plus, ces anticorps monoclonaux ont été essayés pour doser l'histamine dans quelques échantillons de poisson par une technique ELISA d'inhibition. Les résultats obtenus par le 4C9 sont satisfaisants.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Avrameas S., Ternynck T. & Guesdon J-L. (1978) Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Scand. J. Immunol.* 8 (suppl.7): 7
- Blatter W.A., Kuenzi B.S., Lambert J.M. & Senter P.D. (1985) New heterobifunctional protein cross-linking reagent that forms an acid-labile link. *Biochemistry* 24: 1517-1524
- Bruck C., Portetelle A., Glineur C. & Bollen A. (1972) One step purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid by DEAE. Affi-gel blue chromatography. *J. Immunol. Methods* 53: 313-319
- Carlsson J., Drevin H. & Axen R. (1978) Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidyl-3-(2-pyridyl dithio) propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem. J.* 174: 723-737
- Friguet B., Djvadi-Ohaniance L., Bussard Page A. & Goldberg M. (1983) A convenient Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the subunit of Escherichia coli Tryptophan synthase. *Journal of Immunological Methods* 60: 351-358
- Friguet B., Chaffote A.F., Djavadi-Ohaniance L. & Goldberg M.E. (1985) Measurement of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* 77: 305-319
- Guesdon J.L., Chevrier D., Mazié J.L., David B. & Avrameas S. (1986) Monoclonal anti-histamine antibody preparation, characterization and application to enzyme immunoassay of histamine. *J. Immunol. Methods* 87: 69-78
- Guesdon J-L., Chevrier D., Fadel R. & Avrameas S. (1988) Dosage immunoenzymatique de l'histamine. *Allergie et Immunologie* 20 (9) : 336-342
- Hammar E., Berglund A., Hedin A., Norman A., Rustas K., Ytterstrom U. & Akerblom E. (1985) An enzyme immunoassay for histamine based on monoclonal antibodies. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*. Stockholm, Poster
- Hashida S. (1984) More useful maleimide compounds for the conjugation of Fab' to horseradish peroxidase through thiol groups in the hinge. *J. Applied Biochem.* 6: 56-63
- Klotz J.M. & Hunton D.L. (1971) Properties of graphical representation of multiple classes of binding sites. *Biochemistry* 10: 3065-3069
- Köhler G. & Milstein C. (1975) Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* (London) 256: 495
- Lubeck M.D. & Gerhard W. (1981) Topological mapping of antigenic sites on influenza A/RP/8/34 virus hemagglutinin using monoclonal antibodies. *Virology* 113: 64-72
- Luten J.B., Bouquet W., Seuren L.A.J., Burggraaf M.M., Riekwel-Booy G., Durand P., Etienne M., Gouyou J.P., Landrein A., Ritchie A., Lecklerck M. & Guinet R. (1992) A European intercomparaison exercise on the determination of biogenic amines in herring and tuna by 35 laboratories in Quality Assurance in the fish industry, Huss H.H. and coll. (eds), Elsevier Science Publishers.
- Mita H., Yasueda H., Shida T. & Baba S. (1984) An attempt to produce an antibody to histamine and histamine derivatives. *Agents Action* 14 : 574-579
- Montesano L., Cawlen D. & Herschman H.R. (1982) Disuccinimidyl suberate cross-linked Ricin does not inhibit cell-free protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109: 7-13
- Morel A.M. & Delaage M.A. (1988) Immunoanalysis of histamine through a novel chemical derivatization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82: 646-654
- Peyret L.M., Moreau P., Dulluc J. & Geffard M. (1986) Antibodies to histamine: specificity studies and radioimmunological assay. *J. Immunol. Methods* 90: 39-45
- Serrar D., Brebant R., Bruneau S. & Denoyel G-A. (1994) The development of a monoclonal antibody-based ELISA for the determination of histamine in Food. Application to fishery products and comparison with the HPLC assay (publication acceptée par *Food Chemistry*)