



UNIVERSITE DE PARIS VI
D.E.A. de MICROBIOLOGIE

CLASSÉ : RAPPORTS

PRODUCTION ET ETUDE DE LA SPECIFICITE D'ANTICORPS MONOCLONAUX
OBTENUS AVEC LE VIRUS DE LA RAGE PASTEUR.

Geneviève LIBEAU
107, rue de Reuilly
75012 PARIS

LABORATOIRE : UNITE DE LA RAGE
Institut Pasteur, Paris.
Tél. : 306-19-19 - P. 3200.

Responsable : Professeur P. SUREAU.

11/2 51 975



3 (UNIVERSITE DE PARIS VI
D.E.A. de MICROBIOLOGIE 1984. 41/1

PRODUCTION ET ETUDE DE LA SPECIFICITE D'ANTICORPS MONOCLONAUX
OBTENUS AVEC LE VIRUS DE LA RAGE PASTEUR.) 2

Geneviève LIBEAU) 4
107, rue de Reuilly
75012 PARIS

LABORATOIRE : UNITE DE LA RAGE
Institut Pasteur, Paris.
Tél. : 306-19-19 - P. 3200.

Responsable : Professeur P. SUREAU.

Mes remerciements vont au Professeur P. Sureau qui à bien voulu m'accueillir dans l'Unité de la Rage , ainsi qu'à l'équipe du Centre Antirabique pour son aide et son soutien constant.

Je saisis l'occasion qui m'est offerte pour exprimer au Docteur A. Provost ma profonde gratitude pour m'avoir permis d'effectuer ce stage dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux.

Je remercie particulièrement Monique Lafon pour m'avoir efficacement orientée dans mon travail .

J'exprime ma gratitude à Pierre Rollin pour les conseils amicaux et la contribution précieuse qu'il a apporté au bon déroulement de mon travail.

Je remercie également Madame Servigne qui a assuré la dactylographie de ce mémoire.

R E S U M E

Des anticorps monoclonaux obtenus avec la souche de virus de rage fixe Pasteur (PV) ont été caractérisés au regard de leur réactivité avec les structures de la nucléocapside et de la glycoprotéine membranaire de différentes souches rabiques et de souches apparentées à la rage (MOKOLA, DUVENHAGE et LAGOS-BAT).

Parmi les anticorps spécifiques de la nucléocapside, deux réagissent exclusivement avec les souches de rage, tandis que les autres, outre leur réactivité avec les souches de rage décèlent des différences au sein du groupe de virus apparentés à la rage.

Parmi les anticorps monoclonaux spécifiques de la glycoprotéine, quatre neutralisent in vitro les souches rabiques et la souche apparentée MOKOLA ; un seul ne neutralise que les souches rabiques.

Les propriétés de ces anticorps monoclonaux permettent leur utilisation à des fins diagnostiques.

SOMMAIRE

- Introduction	1
- Matériel et méthodes	3
I - Cellules	3
II - Virus	4
A/ Souches virales	4
B/ Propagation du virus	5
C/ Purification du virus	5
III - Fusion cellulaire et obtention d'anticorps monoclonaux ...	5
A/ Immunisation des animaux*.....	5
B/ Fusion et sélection des hybridomes	6
C/ Entretien des cellules et clonage	7
D/ Congélation	7
E/ Production d'anticorps monoclonaux	8
IV - Spécificité des anticorps et titrage	8
A/ Test immunoenzymatique	8
a - expérience type	8
b - caractérisation des isotypes	9
c - titrage des anticorps	9
B/ Test d'immunofluorescence indirecte et test de neutrali- sation	10
a - titrage du virus	10
b - spécificité antinucléocapside et antiglycoprotéine des anticorps monoclonaux	10
c - test de neutralisation	11
- Résultats	12
I - Etat immun des animaux et fusions	12
A/ Contrôle de l'immunité	12
B/ Comparaison des résultats de fusion obtenus avec diffé- rents protocoles d'immunisation	12
C/ Existence de partenaires préférentiels de fusion	13

<i>II - Caractérisation des anticorps monoclonaux</i>	<i>13</i>
<i>A/ Sélection des hybridomes sécréteurs et caractérisation des isotypes</i>	<i>13</i>
<i>B/ Spécificité antinucléocapside</i>	<i>14</i>
<i>C/ Spécificité antiglycoprotéine</i>	<i>14</i>
<i>D/ Activité neutralisante des anticorps antiglycoprotéine.</i>	<i>15</i>
<i>E/ Profil antigénique des virus de rage des rues</i>	<i>15</i>
<i>F/ Titre des anticorps</i>	<i>16</i>
<i>G/ Particularité des clones PVC et PVF</i>	<i>17</i>
<i>- Discussion et Conclusion</i>	<i>18</i>

ABREVIATIONS

<i>BHK</i>	<i>Baby Hamster Kydney</i>
<i>BSA</i>	<i>Bovine serum albumin</i>
<i>CVS</i>	<i>Challenge virus standard</i>
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
<i>DO</i>	<i>Densité optique</i>
<i>G</i>	<i>Glycoprotéine</i>
<i>HAT</i>	<i>Hypoxanthine-aminoptérine-thymidine</i>
<i>IFI</i>	<i>Immunofluorescence indirecte</i>
<i>Ig</i>	<i>Immunoglobuline</i>
<i>M</i>	<i>Protéine membranaire</i>
<i>MEM</i>	<i>Eagle's minimum essential medium</i>
<i>MEM10</i>	<i>MEM supplémenté avec 10 % de SVF</i>
<i>NC</i>	<i>Nucléocapside</i>
<i>NTE</i>	<i>NaCl, Tris-HCl, EDTA</i>
<i>OPD</i>	<i>Orthophénylène diamine</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<i>PEG</i>	<i>Polyéthylène glycol</i>
<i>Po</i>	<i>Péroxydase</i>
<i>PV</i>	<i>Virus Pasteur</i>
<i>rpm</i>	<i>Rotation par minute</i>
<i>SVF</i>	<i>Sérum de veau foetal</i>
<i>TIE</i>	<i>Test immunoenzymatique</i>
<i>UA</i>	<i>Unité arbitraire</i>
<i>UFP</i>	<i>Unité formant plage</i>

INTRODUCTION

L'intérêt porté ces dernières années à la technique d'hybridation des cellules lymphocytaires provient de ce que, contrairement aux anticorps d'un immunosérum, de classes, d'affinités et de spécificités variables, les anticorps monoclonaux sont des réactifs chimiquement homogènes capables de reconnaître des épitopes uniques sur une molécule antigénique et qui peuvent être produits en quantité indéfinie dans la mesure où la lignée cellulaire est stable. Ces propriétés sont d'un intérêt évident pour la constitution de banques d'un matériel de diagnostic standardisé.

Des anticorps monoclonaux contre différents virus ont été préparés (Askonas, 1982), et leur champ d'application est déjà très vaste. En ce qui concerne le virus rabique, de tels réactifs ont permis de mettre en évidence l'existence de variations antigéniques au niveau de 2 protéines virales : la nucléocapside (NC) et la glycoprotéine (G), (Wiktor et al, 1980), Sureau et al, 1983), et de construire leurs cartes antigéniques (Lafon et al, 1983, Lafon et al, 1984, résultats non publiés).

Les anticorps monoclonaux déjà produits (Wiktor et Koprowski, 1978) mettent nettement en évidence les variations antigéniques pour les souches de virus des rues et pour les virus apparentés (Flamand et al, I et II, 1980). Toutefois, pour les souches vaccinales et les souches de laboratoire, les différences sont faibles, voire inexistantes. Ainsi, les nucléocapsides des souches vaccinales ERA, CVS, PV, PM sont identiques. L'utilisation d'une souche vaccinale non encore utilisée pour la sélection d'anticorps monoclonaux devrait permettre de révéler de nouveaux épitopes. Le choix s'est porté sur la souche vaccinale de l'Institut Pasteur (PV).

Si la technique d'isolement des anticorps monoclonaux est maintenant devenue routinière, il n'en reste pas moins à standardiser un certain nombre de méthodologies de base, en particulier le protocole d'immunisation des animaux qui est de première importance pour le succès des fusions. L'état immun des animaux dont la rate sera prélevée doit être excellent. En effet, dans la population splénique, toutes les cellules n'ont pas la même capacité d'engendrer un hybridome. On a montré qu'une cellule sur 200 est sécrétrice

d'anticorps, et parmi celles-ci, 1 sur 5 engendre un hybridome sécréteur (Coutinho cité dans Köhler et Schulman, 1978). C'est pourquoi, nous nous sommes attachés tout d'abord, en étudiant plusieurs cinétiques d'immunisation, à déterminer la méthodologie optimale.

Nous avons ensuite caractérisé les anticorps obtenus, lors de différentes fusions, en testant leur réactivité avec les structures de la nucléocapside ou de la glycoprotéine de différentes souches de virus rabiques et de virus apparentés.

MATERIEL ET METHODES

I - CELLULES.

Les cellules BHK : Cette lignée cellulaire issue d'un explant de rein de hamster Syrien (Stoker et Mac Pherson, 1961), est utilisée pour la propagation du virus, les tests d'immunofluorescence et les tests de neutralisation. Elle est cultivée en milieu MEM additionné de 10 % (MEM 10) de sérum de veau foetal (SVF).

Le myélome Sp2/o : La lignée cellulaire myéloïde utilisée est Sp2/o, abréviation de Sp2/o-Ag 14 (Schulman et al, 1978). Elle dérive d'un hybride X63-Ag8X Balb/c et est non sécrétrice. Les cellules Sp2/o sont mises en culture dans des plaques Costar constituées de 6 puits (réf. 3506) à la concentration de $2,5 \cdot 10^4$ cellules/ml dans du milieu DMEM additionné de 10 % de SVF, 1 % de pyruvate de sodium (100 mM) et d'antibiotiques (Gibco, réf. 514). Le maintien des cellules en phase exponentielle se fait par passage tous les 2-3 jours dans du milieu frais. Elles sont récoltées à la concentration d'environ $2,5 \cdot 10^5$ cellules/ml. Cent cinquante à 200 ml de suspension cellulaire sont nécessaires pour une fusion avec deux rates immunes.

Les cellules sont centrifugées, 10 mn à 1000 rpm à température ambiante, comptées et resuspendues dans 10 ml de DMEM complet à la concentration de $3,5 \cdot 10^6$ cellules/ml.

Les cellules spléniques immunes : Les animaux sont sacrifiés, puis immergés dans l'alcool à 90 %. Les rates sont prélevées stérilement (2 animaux par fusion), broyées sur une gaze de nylon stérile à l'aide d'un piston de seringue jetable. Après sédimentation des gros débris, les cellules sont lavées 3 fois à 1000 rpm, 10 mn, à température ambiante dans du DMEM sans SVF, comptées et ajustées à $3,5 \cdot 10^7$ cellules/ml dans du milieu complet. La viabilité est déterminée par examen au microscope à contraste de phase en présence de bleu Trypan.

Les macrophages péritonéaux : Ils sont récoltés stérilement sur souris Balb/c à l'aide d'une aiguille de 1,2-40 mm après injection en intrapéritonéale (i.p.) de 4 ml de milieu DMEM. Les cellules sont lavées 5 mn à 1000 rpm et le culot est resuspendu dans du milieu complet, à la concentration de $2,0 \cdot 10^5$ cellules/ml.

Les thymocytes : Des souris Balb/c, âgées de 3-4 semaines, sont sacrifiées par dislocation des vertèbres cervicales ; le thymus est prélevé aseptiquement et les cellules remises en suspension par pipetage. La suspension cellulaire est lavée dans du milieu DMEM, les cellules sont comptées et resuspendues à la concentration de $5 \cdot 10^7$ cellules/ml.

II - VIRUS.

A - Souches virales.

PV : La souche Pasteur, isolée en 1882, a été entretenue par passages intracérébraux de lapin à lapin. Cette souche a transité par les Etats-Unis et est revenue à l'Institut Pasteur en 1965 (Lépine et al, 1974). Elle a été adaptée à la culture cellulaire BHK 21 et renommée PV/BHK.

ERA Connaught : Cette souche rabique atténuée a été isolée d'un chien en 1935. Elle a été adaptée à la culture de cellules de rein de porc, puis passée sur souris et rein de hamster (Abelseth, 1964). Elle est distribuée par l'ATCC (American Type Culture Collection).

CVS (Challenge Virus Standard) : Cette souche virale, issue de la souche Pasteur, a été adaptée à la culture cellulaire (Kissling, 1958). Elle provient de l'Institut du Wistar (Philadelphie, USA).

MOKOLA : La souche MOKOLA a été isolée d'un rongeur insectivore en 1981 (Saluzzo et al, 1984). Elle a été adaptée à la culture cellulaire (BHK 21) après 6 passages.

Souches des rues : Ce sont des souches d'origine humaine ou animales conservées par le Centre International de Référence de l'Institut Pasteur. L'étude par immunofluorescence est réalisée sur calques, soit à partir du cerveau original, soit à partir de cerveaux de souris après 1 ou 2 passages.

Souche vaccinale PV/RV : La souche de virus vaccinale est issue de la souche PV après adaptation sur cellules de rein de veau de premier explant (Atanasiu et al, 1977). Après inactivation, le vaccin est lyophilisé et chaque dose vaccinale de 1 ml (lot 004) correspond à un titre de $10^{6,5}$ UFP/ml. La quantité de protéine totale est supérieure ou égale à 50 µg/ml et les protéines d'origine bovine sont comprises entre 0,3 et 1 µg/ml. Le vaccin est distribué par I.P.P. (Institut Pasteur Production).

B - Propagation du virus.

Des cellules BHK 21 en suspension sont infectées avec une multiplicité d'infection de 0,5 à 1, pendant 1 heure à 37° C, et mises en culture 24 heures à 37° C en MEM 10, puis six jours à 33° C, en milieu MEM en présence de 0,3 % de sérum albumine bovine (BSA).

C - Purification du virus.

La méthode de purification du virus est une adaptation de celle décrite par Wiktor et al (1977). Après élimination des débris cellulaires, le surnageant est centrifugé 8 heures à 14000 rpm à 4° C sous vide en rotor J 14 (Ultracentrifugeuse Beckman Y21). Le culot obtenu est dissout 24 heures dans 0,5 ml de NTE (Sokol et al, 1968) à 4° C, repris dans un tube de 15 ml conique, et centrifugé 15 mn à 3000 rpm pour éliminer les grands agrégats. Le surnageant viral, placé au sommet d'un gradient de saccharose (20 % - 50 %) est centrifugé 90 mn à 4° C, sous vide, à 25000 rpm sur rotor SW 28. La bande virale est prélevée par le haut du tube de nitrocellulose, repris dans du NTE et centrifugé une nouvelle fois à la même vitesse. Le culot peut être conservé desséché à -20° C ou dilué dans un petit volume de NTE à -70° C.

III - FUSION CELLULAIRE ET OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX.

A - Immunisation des animaux.

Des souris consanguines Balb/c femelles âgées d'un mois reçoivent i.p. une injection primaire d'une dose de vaccin PV/RV₃₁. La moitié d'entre elles ont un rappel par voie intra-veineuse (i.v.) du virus

vivant PV/BHK purifié et concentré (25 $\mu\text{g/souris}$) dans un volume de 200 μl , 3 jours avant la fusion qui est réalisée 10, 15, 20 et 75 jours après la primo-vaccination.

Une désensibilisation des animaux est obtenue par injection sous-cutanée de 50 μl de solution de rappel, une demi-heure avant l'injection i.v.

Les animaux soumis aux différents protocoles d'immunisation sont saignés au niveau du plexus rétroorbital. Les prélèvements sont réalisés à 6, 10, 12, 15, 20, 66, 75 jours en réponse primaire et à partir du 10ème jour en réponse secondaire, le rappel ayant été fait trois jours avant.

B - Fusion et sélection des hybridomes.

La méthode utilisée dérive de celle décrite par Galfré et al (1979). Le polyéthylène glycol (PEG) est utilisé (Pontécorno, 1975) pour induire une agglutination en masse des cellules lymphocytaires obtenues sous forme de culot de centrifugation. La méthode tient compte de l'effet toxique du PEG à différents niveaux : précipitation des protéines, hypotonicité, endommagement des membranes cellulaires.

Les partenaires de fusion : $3,5 \cdot 10^8$ splénocytes et $3,5 \cdot 10^7$ Sp2/o sont mélangés, puis centrifugés à 1000 rpm, 5 mn à température ambiante ; le surnageant est ensuite soigneusement éliminé. Le culot est homogénéisé ; 0,5 ml de PEG 45 % (MERCK, mw 1500), puis 0,5 ml de PEG 25 % dilués dans du DMEM sans SVF sont additionnés. Le culot est centrifugé à 1000 rpm, et le PEG éliminé. L'ensemble des étapes ne doit pas excéder 9-10 mn.

Les cellules sont remises en suspension par addition progressive de 45 ml de milieu DMEM conditionné (50 % de surnageant Sp2/o). La suspension cellulaire est distribuée dans un volume de 100 μl sur 4 à 5 plaques Falcon de 96 cupules (réf. : 3072). Du DMEM conditionné est rajouté à concurrence de 200 μl par cupule.

Vingt quatre heures après la fusion, la moitié du surnageant de cultures est remplacé par le même volume de milieu de sélection DMEM-HAT (10^{-4} M d'hypoxanthine, $4 \cdot 10^{-7}$ M d'Aminoptérine, $1,6 \cdot 10^{-5}$ M de Thymidine, Littlefield, 1964). Ceci est renouvelé pendant deux à trois jours, puis une fois par semaine jusqu'à ce que les hybridomes deviennent visibles. Les premiers hybridomes sont détectables dès le 7ème jour, au microscope à contraste de phase (Olympus, réf. CKP - B1 - I).

C - Entretien des cellules et clonage.

Entretien :

Dans la semaine qui suit la fusion, le nombre de cellules en culture est drastiquement diminué par le milieu de sélection : des cellules "nourricières" sont ajoutées à partir du 2ème jour suivant la fusion. Il s'agit d'abord de thymocytes ($2,5 \cdot 10^6$ cellules/cupule), puis de macrophages péritonéaux (10^4 cellules/cupule). Elles sont indispensables pour maintenir les cultures.

Pendant deux à quatre semaines, l'entretien consiste à nourrir régulièrement les cultures, à dédoubler les microcultures en 96 puits et à les amplifier dans des plaques de 24 et de 6 puits (Costar, réf. : 3524 et 3506).

L'identification des hybridomes producteurs d'anticorps, suivie du clonage, est menée en parallèle.

Clonage :

Les cellules sont clonées par dilution limite dans des plaques de 96 cupules. Les deux premières lignes contiennent en moyenne 5 cellules/cupule, les deux suivantes, 2,5 cellules/cupule et les restantes, 1 cellule/cupule. Environ 2,3 ml d'une solution contenant 100 cellules par ml sont suffisants pour couvrir une plaque 96 cupules avec 50 μ l/cupule.

L'adaptation progressive au milieu de culture initial DMEM est commencé après le clonage. Pour ceci, on utilise comme milieu intermédiaire le milieu HT (Hypoxanthine, Thymidine).

D - Congélation.

Environ 10^6 à 10^7 cellules sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10 mn à température ambiante. Le surnageant est gardé sous forme d'aliquots de 4 ml ou 8 ml à -70° C et le culot remis en suspension dans 0,5 ml de milieu de congélation à 4° C (9 parts de SVF et une part de diméthylsulfoxyde). Les cryotubes (Nunc, réf. 366656) sont congelés par paliers jusqu'à -70° C avant leur transfert dans un container à azote liquide.

E - Production d'anticorps monoclonaux.

De grandes quantités d'anticorps peuvent être obtenues par culture des hybridomes *in vitro*, ou par production d'ascite *in vivo*.

- Production in vitro : surnageants de cultures cellulaires.

Les hybridomes sont mis en culture dans des plaques Costar de 6 puits, à raison de $2,5 \cdot 10^4$ cellules/ml environ, dans du milieu DMEM - 10 % de SVF. Les repiquages sont effectués tous les 2-3 jours afin de garder les cellules en phase exponentielle. Le surnageant est récolté en fin de croissance cellulaire.

- Production in vivo : ascites.

Des souris Balb/c âgées de six mois sont injectées *i.p.* avec 0,5 ml de pristane 2, 6, 10, 14 tétraméthylpentadécane (Janssen Pharmaceutica, réf. : T. 2280-2) et laissées 15 jours au repos avant l'inoculation de 10^6 hybridomes *i.p.*. L'ascite est recueillie stérilement au bout de 2-3 semaines avec une aiguille 1,2 - 40 mm.

IV - SPECIFICITE DES ANTICORPS ET TITRAGE.

La spécificité des anticorps sériques ou produits par les hybridomes est déterminée par des tests immunoenzymatiques, des tests de fluorescence indirecte et des tests de neutralisation.

A - Test immunoenzymatique.

a) Expérience type : cinétique d'apparition des anticorps chez les animaux immuns :

Les anticorps sont testés pour leur capacité à se lier à un antigène rabique fixé à un support de polystyrène. Le TIE Rage Pasteur est un kit mis au point par P. Perrin (Atanasiu et al, 1980), selon la méthode établie par Voller et Bidwell (1974). Les plaques ont été préalablement sensibilisées par le virus PV/BHK ; elles sont lavées 3-4 fois avec du tampon phosphate/ 0,5 % Tween 20, ph 7,0 (PBS/Tween) à l'aide d'un dispositif de distribution et de vidange des cupules (Dynatech, réf. : Miniwash AM52). Deux cent cinquante μ l d'anticorps dilués dans du PBS/Tween/0,5 % BSA sont incubés une heure à 37° C dans une étuve humide. Après 3-4 lavages, 250 μ l d'anticorps

conjugué à la peroxydase (Po) (Atanasiu et al, a/1977) sont mis en contact une heure à 37° C. Ces conjugués sont des sérums de lapin anti-IgG (H+L)-Po ou de chèvre anti-IgM (Fc)-Po de souris (Nordic Immunology). Après un dernier lavage, 250 µl de substrat enzymatique sont mis à incuber à l'obscurité une demi-heure à température ambiante. L'eau oxygénée H2O2 catalyse la réaction d'oxydation de l'orthophénylène diamine OPD (0,4 mg/ml, couleur jaune) dans le tampon citrate pH 5,0.

La densité optique est enregistrée à 492 nm par un lecteur automatique Titertek Multiskan (Flow Laboratories, réf. 78 530 00) après arrêt de la réaction avec 10 µl d'acide sulfurique 18 N. La comparaison des D.O. avec celle d'une gamme étalon (sérum positif humain) permet d'apprécier la concentration relative des immunoglobulines (Ig) de classe G ou M des sérums et de donner un titre en unités arbitraires (UA).

b) Caractérisation des isotypes :

La caractérisation de l'isotype d'un anticorps monoclonal utilise le TIE décrit au paragraphe précédent, avec la modification suivante. Les anticorps que l'on cherche à caractériser sont mis en contact avec 200 µl d'immunoglobuline de chèvre anti IgG1 (1/2000^e), anti IgG2a (1/2000^e) anti IgG2b (1/8000^e), anti IgG3 (1/8000^e) et anti Ig (1/4000^e, Nordic Immunology). L'incubation est d'1 heure à 37° C. Finalement, l'addition de 200 µl d'un conjugué peroxydase anti IgG (H+L) de chèvre préparé chez le lapin, dilué au 1/4000^e, suivi d'une réaction classique immunoenzymatique OPD/H2O2 permet de révéler l'isotype de l'anticorps monoclonal.

c) Titrage des anticorps :

Le titre des anticorps monoclonaux est déterminé après avoir fait réagir des quantités variables d'anticorps en regard d'une quantité fixe de virus en TIE (paragraphe IV. A. a). La modification suivante est introduite par rapport à l'expérience type. Les surnageants d'hybridomes sont dilués de 3 en 3 à partir du 1/3 jusqu'au 1/6561^e. Les ascites sont diluées de 3 en 3 à partir d'une dilution au 1/100 jusqu'au 1/218700. Le volume final de chaque cupule est de 0,2 ml.

Le titre de la solution d'anticorps est choisi arbitrairement comme étant la dilution de l'anticorps correspondant à l'intersection de la courbe et de l'abscisse. La dilution correspondant à l'infléchissement du plateau est considérée comme la solution de travail.

B - Tests d'immunofluorescence indirecte et de neutralisation.

La détermination de la spécificité antinucléocapside (anti-NC) ou antiglycoprotéine (anti-G) des anticorps monoclonaux, le titrage et la neutralisation du virus utilisent une microméthode en plaques Terasaki (Falcon réf. : 3034) dérivée de la technique décrite par Koprowski et Wiktor (1980).

a) Titration du virus :

Le virus est dilué de 10 en 10 dans du MEM 10 (1 à 10^{-5}) en plaques Falcon de 96 puits, et chaque dilution est mise en présence d'une suspension de cellules BHK 21 (10^6 cellules/ml). Les cellules infectées sont immédiatement transférées dans une Terasaki (10 μ l/cupule) et incubées 3 jours avant coloration (paragraphe IV. B. c.). Le titre du virus est l'inverse de la dilution la plus forte donnant 50% de cellules infectées.

b) Spécificité antinucléocapside et antiglycoprotéine des anticorps.
Titration.

- sur cellules infectées et fixées à l'acétone :

Le test mis au point par Coons et Kaplan (1950) permet de révéler la spécificité anti-NC ou anti-G de membrane de l'anticorps d'après les images obtenues en test de fluorescence indirecte sur cellules infectées et fixées ; une fluorescence en amas intracytoplasmique est dite de nucléocapside, une fluorescence diffuse est dite de "membrane".

Une suspension de cellules BHK 21 infectées (à 80 % : cf paragraphe précédent), ajustées à $2 \cdot 10^6$ /ml est distribuée dans une Terasaki (10 μ l/cupule) et incubée 24, 48 et 72 heures. Les plaques sont lavées au PBS avec Ca^{++} et Mg^{++} et fixées 30 mn par un mélange acétone eau (80-20). Dix μ l d'anticorps à la dilution de travail (recherche de la spécificité des hybridomes) ou à des dilutions de raison 3 ($1/100^e$ à $1/24300$: titrage des ascites) sont incubés 30 mn à 37° C à l'étuve humide. Après deux lavages, 10 μ l de globulines de lapin anti IgG de souris couplées à la fluorescéine (I.P.P. - réf. : 74641) sont incubés, dilués au $1/40^e$. L'addition de Bleu Evans au $1/20000^e$ facilite la lecture au microscope à fluorescence (Zeiss). L'intensité de fluorescence est évaluée par un système de croix (0 = pas de fluorescence, +, ++, +++, fluorescence de plus en plus intense).

- sur impressions de cerveaux :

La méthode de calques de cerveaux (Goldwasser et Kissling, 1958) est utilisée pour l'étude rapide du profil antigénique des souches des rues, à l'aide des anticorps antinucléocapside.

Une série d'impressions sur lames est réalisée à partir d'un prélèvement original ou d'un passage sur souriceaux. Le test de fluorescence indirecte suit les étapes décrites au paragraphe précédent.

c) Test de neutralisation.

La technique mise au point par Wiktor et Koprowski (1980) a été modifiée et adaptée à la culture en plaques Terasaki.

Le virus est dilué de 10 en 10 dans du milieu MEM 10 (1 à 10^{-5}). Cinquante μ l de chaque dilution sont répartis dans une plaque de 96 puits contenant déjà 50 μ l d'anticorps monoclonal. Un témoin virus est prévu. Après une heure d'incubation à 37° C, 50 μ l d'une suspension de cellules BHK 21 à 10^6 cellules/ml sont additionnées. Dix μ l du contenu de chaque cupule sont transférés sur Terasaki. Une incubation de 3 jours permet une amplification suffisante du test. Les plaques sont lues après fixation à l'acétone (80-20) et révélation des cellules infectées par un sérum de lapin anti-NC couplé à la fluorescéine (dilution 1/40^e : I.P.P. - réf. : 72114).

La dilution la plus forte du virus capable d'infecter les cellules est déterminée en absence d'anticorps et en présence de chaque anticorps monoclonal. L'index de neutralisation est la différence entre les logarithmes décimaux de ces deux titres.

RESULTATS

I - ETAT IMMUN DES ANIMAUX ET FUSIONS.

A - Contrôle de l'immunité.

Le pouvoir immunogène du vaccin associé à un rappel de virus vivant injecté i.v. est évalué par l'étude cinétique de l'immunité humorale spécifique. C'est un contrôle indirect de la quantité de cellules spléniques sécrétrices d'anticorps à différents temps de l'immunisation.

Le taux des anticorps antirabiques est titré en TIE, selon la méthode décrite au paragraphe IV. A. a), c'est à dire en utilisant des plaques tapissées d'antigène PV/BHK et en étudiant l'intensité de la reconnaissance antigène-anticorps. Les résultats présentés (Fig. 1) sous forme d'un graphique soulignent l'importance du rappel par voie intraveineuse. Entre 10 et 15 jours après l'injection primaire, le rappel i.v. est capable d'augmenter très rapidement (3 jours) et à un taux élevé le titre des IgG et des IgM qui passent respectivement de 25 UA à 114 UA et de 4 UA à 164 UA. A 20 jours, le rappel stimule toujours la réponse IgG (50 UA à 140 UA) et encore assez bien la réponse IgM (5,5 UA à 130 UA). A 66 et à 75 jours, par contre, le titre d'IgM ne varie pas du niveau de base et la réponse en IgG atteint un plateau, trois jours après le rappel.

B - Comparaison des résultats de fusion obtenus avec différents protocoles d'immunisation.

Le contrôle de l'état immun des animaux a montré la présence de cellules B sécrétrices d'anticorps rabiques à un taux appréciable, dès le 10ème jour.

Nous avons donc cherché à raccourcir le temps d'immunisation qui, dans le protocole classique, est de 75 jours (Wiktor et Koprowski, 1978), tout en conservant de bons rendements d'hybridomes.

Pour cela, une série de fusions a été effectuée avec des rates de souris immunisées 10, 15 et 20 jours auparavant. Nous avons aussi cherché à montrer l'importance du rappel (Fig. 2).

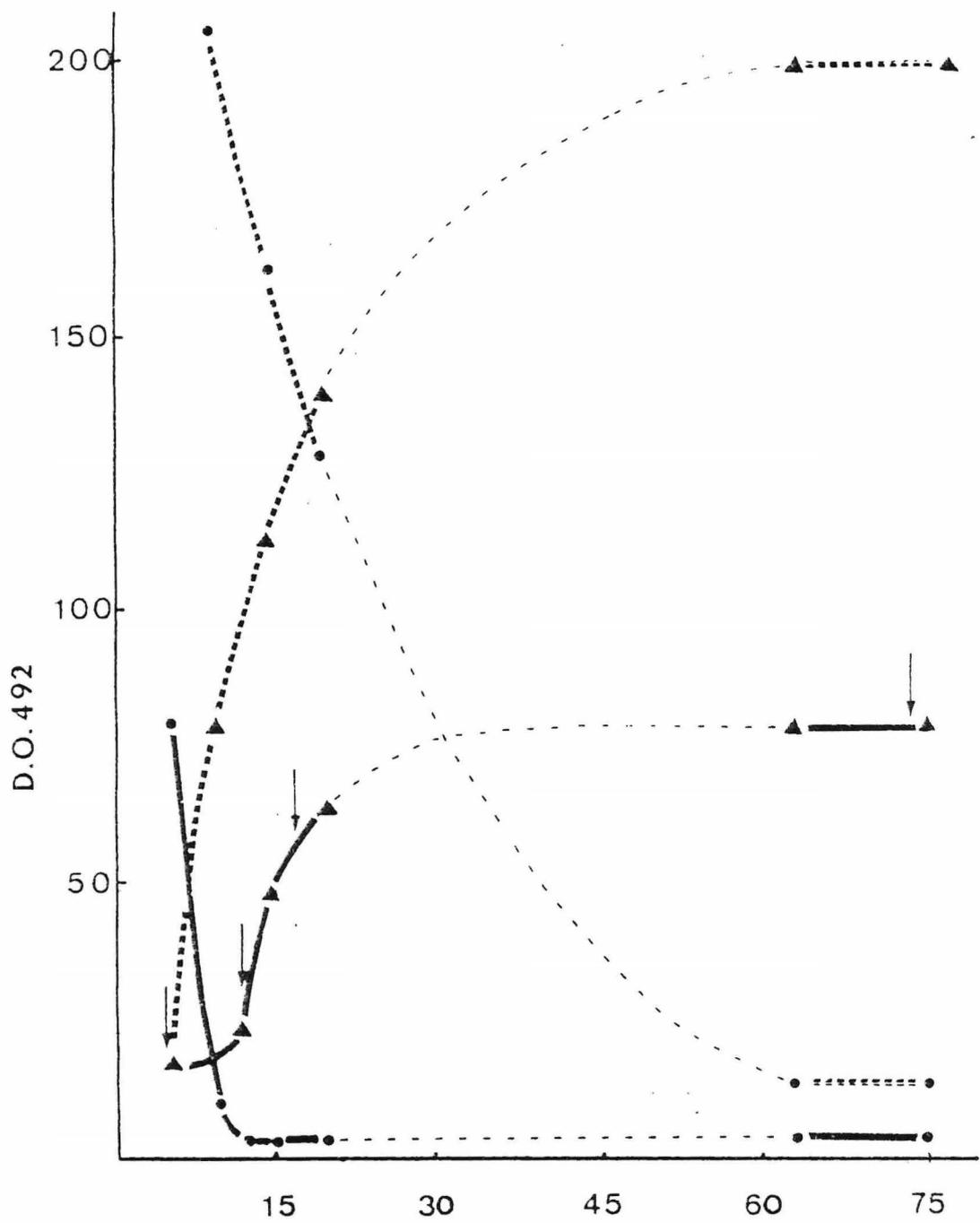


Fig.1 Taux d'anticorps antirabiques chez les Balb/c immunisées par le vaccin PV. Titres en T.I.E. des IgG ▲, des IgM ●, en réponse laire --- et laire — Rappel i.v. ▼ 3 jours avant la fusion.

jour de la fusion	<i>F</i>	10	15	20	75
jour du rappel	↓	7	12	17	72

3 souris par

groupe

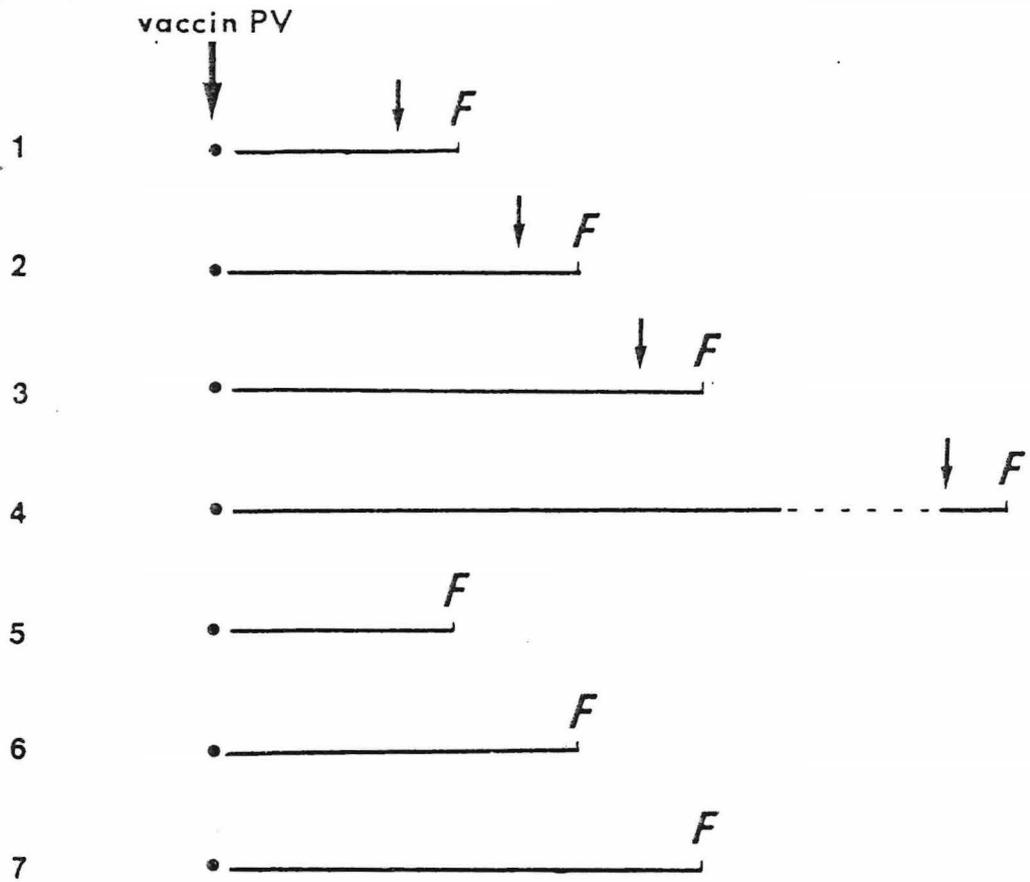


Fig.2 Protocole d'immunisation.

Le tableau I résume les résultats obtenus dans les quatre fusions. Les cultures provenant de souris non rappelées se sont avérées négatives : le rappel i.v. est donc indispensable à l'obtention d'hybridomes. Dans la fusion réalisée à 75 jours selon le protocole classique, 19 hybridomes ont été obtenus ; 48 % d'entre eux sont positifs et secrètent des IgG. Dans le protocole d'immunisation accéléré associé au rappel i.v., les hybridomes sont obtenus dans la fusion réalisée à 10 jours où 63 % d'entre eux sont positifs et se répartissent en deux types, les uns secrétant des anticorps de classe IgG (60 %), et les autres des IgM (40 %). Pour les fusions réalisées à 15 et 20 jours, peu ou pas d'hybridomes apparaissent.

C - Existence de partenaires préférentiels de fusion.

Pour chaque protocole d'immunisation, le sérum de deux souris a été prélevé et a été titré en TIE à l'aide d'un sérum anti-IgG et d'un sérum anti-IgM. Alors que l'on observe une prépondérance des IgM sériques dans le protocole d'immunisation accéléré, on obtient une conversion presque totale des IgM en IgG à 75 jours d'immunisation. Ceci n'est pas le véritable reflet de la distribution des hybridomes sécrétant d'IgG et d'IgM obtenus dans les fusions correspondantes. Il semble que les splénocytes sécrétant d'IgG soient les partenaires préférentiels de fusion aussi bien à 10 jours (60 % d'hybridomes IgG, contre 27 % de cellules sécrétrices correspondantes), qu'à 75 jours (100 % d'hybridomes IgG, au lieu de 93 % de cellules sécrétrices), ou que les hybridomes sécrétant d'IgG aient une meilleure survie.

II - CARACTERISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX.

A - Sélection des hybridomes positifs et caractérisation des isotypes.

La sélection des hybridomes fonctionnels, puis la caractérisation des classes et des sous-classes d'Ig (isotypes) sont réalisées par TIE. Ce test a été choisi pour sa rapidité d'exécution : les plaques sont déjà tapissées de virus complet homologue (PV/BHK) et sa sensibilité : le surnageant est testé par un faible volume et correspond parfois à une petite colonie de cellules. Ce test peut donc être utilisé précocement.

- T A B L E A U I -

HYBRIDES ANTI-P.V. OBTENUS A DES TEMPS DIFFERENTS DE FUSION

	<u>APRES RAPPEL</u>				<u>SANS RAPPEL</u>			
	10	15	20	75	10	15	20	75
Jours de fusion	10	15	20	75	10	15	20	75
Nombre d'hybrides	16	2	0	19	2	2	0	N.T
Pourcentage d'hybrides positifs.	63 %	0 %	0 %	48 %	0 %	0 %	-	-
Proportion d'hybrides de classes différentes	IgG 60 % IgM 40 %	-	-	100 % 0 %	-	-	-	-
Proportion des classes d'immunoglobulines chez la souris	IgG 27 % IgM 73 %	42 % 58 %	43 % 57 %	93 % 6 %	63 % 37 %	90 % 10 %	94 % 6 %	95 % 5 %

Pour déceler les hybridomes positifs, les sérums de lapin anti-IgG ou de chèvre anti-IgM de souris couplés à la peroxydase (Po) sont préférés au conjugué protéine A-Po qui élimine, dans les conditions de pH utilisées, certains isotypes de souris, en particulier toujours μ , $\gamma 1$ et α , parfois $\gamma 2_b$ (Ey et al, 1978). En outre, l'utilisation de sérums spécifiques constitue l'étape préliminaire à la caractérisation des isotypes (paragraphe IV. A. b.).

Quand la D.O. du tampon de réaction contenant l'OPD est inférieure à 200, on considère que l'anticorps ne reconnaît pas l'antigène. Les résultats obtenus sont significativement supérieurs ou inférieurs à cette valeur. Une ambiguïté subsiste quant à l'hybridome PVD dont le clonage ne permettra pas l'isolement de colonies d'affinité plus forte (Tableau II).

La nomenclature adoptée pour les hybridomes est PVA, PVB, PVC, etc..... et pour les clones, elle est PVA1, PVA2, PVA3, etc...; elle indique que la souche virale utilisée pour l'immunisation est la souche vaccinale (PV). Pour plus de clarté dans les paragraphes qui suivent, les clones provenant d'un même hybridome et qui, avec les moyens d'investigation mis en oeuvre (isotype, affinité), se sont révélés identiques, sont appelés par le nom de l'hybridome correspondant.

B - Spécificité antinucléocapside.

Parmi les hybridomes sélectionnés, 6 colorent en IFI (paragraphe IV. B. b.) des inclusions intracytoplasmiques de cellules fixées et infectées par le virus homologue PV et sont ainsi spécifiques de la NC. Ils ont également été testés en IFI sur des cellules infectées par deux souches de virus rabique (CVS, ERA), et une souche apparentée à la rage (MOKOLA).

Les résultats du tableau III montrent que les hybridomes PVA, PVB, PVG, reconnaissent uniquement les 3 souches rabiques, PV, CVS et ERA. L'hybridome PVC, bien que positif en TIE ne reconnaît pas PV, mais reconnaît parfois CVS et MOKOLA (certains clones).

C - Spécificité antiglycoprotéine.

Parmi les surnageants des 7 hybridomes positifs restants, 5 donnent une fluorescence de membrane sur cellules fixées et infectées par le virus homologue. Les deux autres n'ont pas été caractérisés par ce test (isotope μ non reconnu par le conjugué de lapin anti-IgG de souris).

TARLEAU II :

HYBRIDOMES POSITIFS SELECTIONNES PAR TIE . ISOTYPES ET TITRES

	D. O.	ISOTYPE	TITRE	
			SURNAGEANT	ASCITE
PVA1	1134		1/2187	1/218700
PVA2	1302		1/2187	1/218700
PVA3	1402	Y ₁	1/2187	1/218700
PVA5	1244		1/729	1/218700
PVB1	1112	Y ₁	1/2187	1/21800
PVB8	1097		1/729	
PVC3	1549		1/81	-
PVC4	1561	Y _{2a}	1/81	-
PVC6	1417		1/81	-
PVD1	303		1/27	1/8100
PVD3	75	Y ₁	1/27	1/8100
PVD9	159		1/27	1/8100
PVE3	2000		1/2187	1/218700
PVE7	2000	Y _{2a}	1/2187	1/218700
PVE8	2000		1/2187	1/218700
PVE11	1758		1/2187	1/218700
PVF5	865		1/729	1/218700
PVF8	814	Y _{2a}	1/729	1/218700
PVF9	901		1/729	-
PVG4	814	Y ₃	1/2187	1/72900
PVG14	750		1/729	1/8100
PVI5	710		1/243	1/72900
PVI9	719	Y _{2a}	1/27	1/72900
PVI12	868		1/243	1/218700
PVK11	869		1/27	1/24300
PVK14	870	Y _{2a}	1/9	1/24300
PVK16	762		1/27	nc
PV03	1118		1/243	1/72900
PV04	1493	μ	1/243	nc
PV012	1512		1/243	1/72900
PVP20	870		1/27	nc
PVP21	2000	μ	1/27	1/900
PVP22	2000		1/9	nc
PVQ16	931		1/81	1/24300
PVQ18	914	Y _{2b}	1/243	1/2430
PVQ19	802		1/27	1/900

TABLEAU III :

SPECIFICITE ANTINUCLEOCAPSIDE DES HYBRIDOMES VIS A VIS DES
SOUCHES FIXES DE RAGE ET DE LA SOUCHE MOKOLA EN IFI .

ANTICORPS	SOUCHES			
	PV	ERA	CVS	MOK
PVA1	NC	NC	NC	-
PVB1	NC	NC	NC	-
PVC3	-	-	NC	NC
PVD3	NC	NC	NC	NC
PVG4	NC	NC	NC	-

NC = fluorescence

- = pas de fluorescence

En parallèle, les surnageants ont été testés sur cellules fixées et infectées par les souches CVS, ERA et MOKOLA ; les hybridomes PVE, PVI, PVK et PVQ ne différencient pas les trois souches rabiques, mais permettent de les distinguer de la souche MOKOLA. PVF malgré sa positivité en TIE, donne une très faible fluorescence de membrane avec la souche homologue (Tableau IV).

D - Activité neutralisante des anticorps antiglycoprotéine.

Les 5 hybridomes anti-G, PVE, PVF, PVI, PVK et PVQ et les 2 hybridomes ne présentant pas de fluorescence anti-NC PVO et PVP (Tableau IV) ont été testés pour leur aptitude à neutraliser les souches virales utilisées précédemment. On admet qu'un virus est neutralisé par un anticorps si l'index de neutralisation est égal ou supérieur à trois (paragraphe IV. B. b.). Les résultats sont présentés par un + si l'anticorps est neutralisant et un - s'il ne l'est pas.

Une bonne corrélation est obtenue pour les hybridomes PVE et PVK, entre le test d'IFI et le test de neutralisation, vis à vis des trois souches PV, CVS et ERA ; par contre, PVI et PVQ ne neutralisent pas ou peu CVS alors qu'ils le reconnaissent en IFI.

Les hybridomes PVO et PVP non testés en IFI, sont confirmés comme étant sécréteurs d'anticorps anti-G, puisqu'ils neutralisent les souches PV, ERA et moins bien CVS pour certains clones. L'hybridome PVF qui présente une fluorescence de membrane très faible avec PV, ne le neutralise pas.

PVE (tous les clones testés), PVI, PVQ, PVO et PVF (certains clones), neutralisent MOKOLA, mais aucun ne reconnaît MOKOLA en IFI.

E - Profil antigénique des virus de rage des rues.

La réactivité de quatre anticorps monoclonaux anti-NC est testée contre trente et une souches de virus rabique ou de virus apparenté à la rage (Tableau V). La méthode choisie est l'IFI sur impressions de cerveaux (paragraphe IV. B. b.). Les anticorps 502-2 et 422-2 sont des anticorps monoclonaux de référence anti-NC (don du Dr. T.J. Wiktor, Institut du Wistar, Philadelphie - USA). L'anticorps 502-2 reconnaît les souches rabiques et apparentées, quelle que soit l'origine géographique et l'anticorps 422-2 ne reconnaît que les souches apparentées MOKOLA, LAGOS BAT et DUVENHAGE (Flamand et al, 1980).

TABLEAU IV :
 SPECIFICITE ANTIGLYCOPROTEINE DES HYBRIDOMES VIS A VIS DES
 SOUCHES FIXES DE RAGE ET DE LA SOUCHE MOKOLA EN IMMUNO-
 FLUORESCENCE (F) ET EN TEST DE NEUTRALISATION (N).

ANTICORPS	SOUCHES							
	PV		ERA		CVS		MOK	
	F	N	F	N	F	N	F	N
PVE11	Mb	+	Mb	+	Mb	+	0	+
PVF5	Mb	-	Nt		Nt		0	+
PVI9	Mb	+	Mb	+	0	+	0	+
PVK11	Mb	+	Mb	+	Mb	+	0	-
PVQ12	Nt	+	Nt	+	Nt	+	Nt	+
PVP21	Nt	+	Nt	-	Nt	+	Nt	-
PVQ16	Mb	+	Mb	+	Mb	+	0	+

Mb = fluorescence
 0 = pas de fluorescence
 + = neutralisation
 - = pas de neutralisation
 Nt = non testé

TABLEAU V . PROFIL ANTIGENIQUE DES VIRUS DE RAGE DES RUES ET DES VIRUS APPARENTES A LA RAGE A L'AIDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTINUCLÉOCAPSIDES OBTENU. EN IFI.

		ANTICORPS					
SOUCHES		502-2	422-2	PVA3	PVB1	PVD3	PVG4
RAGE	TUNISIE (6)	+	0	+	+	+	+
	MADAGASCAR (3)	+	0	+	+	+	+
	NAMIBIE (2)	+	0	+	+	+	+
	FRANCE (2)	+	0	+	+	+	+
	THAÏLANDE (1)	+	0	+	+	+	+
	ZAMBIE (1)	+	0	+	+	+	+
	RUANDA (1)	+	0	+	+	+	+
	MAROC (1)	+	0	+	+	+	+
	HAUTE-VOLTA (1)	+	0	+	+	+	+
	SENEGAL (2)	+	0	+	+	+	+
	MALAISIE (2)	+	0	+	+	+	+
	APPARENTEES	MOKOLA Cameroun (1)	+	+	0	+	+
MOKOLA RCA (1)		+	+	0	0	+	0
LAGOS-BAT Nigéria (1)		+	+	0	0	0	0
LAGOS-BAT RCA (1)		+	+	0	+	0	0
DUVENHAGE (1)		+	+	0	+	0	0

+ = fluorescence

0 = absence de fluorescence

() = nombre de souches testées

Les hybridomes PVA3, PVB1, PVG4 et PVD3 ont donné une réaction positive avec toutes les souches rabiques, de plus, PVA3 et PVG4 distinguent les souches rabiques des souches apparentées ; à la différence de quoi PVB1 ne fait pas la distinction entre les souches rabiques et la souche MOKOLA (Cameroun), LAGOS-BAT (RCA) et DUVENHAGE ou de PVD3 qui ne fait pas la distinction entre les souches rabiques et MOKOLA.

F - Titre des anticorps.

Les titres sont déduits de la réaction antigène-anticorps en TIE contre le virus homologue PV et en IFI, contre une batterie de souches virales.

- Test immunoenzymatique :

La réaction antigène-anticorps est étudiée dans le cas de l'hybridome PVA et les clones qui en sont issus, et illustre (Fig. 3 et 4) l'allure des courbes obtenues. Quand l'anticorps est en excès par rapport à l'antigène, la D.O. se maintient en plateau, puis, en fonction de la dilution, elle diminue exponentiellement. Le point de rencontre de la courbe et de l'abscisse définit la dilution correspondant au titre de la solution d'anticorps.

On remarque que les clones appartenant à la même famille ont un comportement identique (allure de la courbe, titre), ce qui est en faveur de la "monoclonalité" de l'hybridome de départ.

Le titre de l'ascite obtenu après injection i.p. du clone à une souris est la plupart du temps 100 fois supérieur au titre obtenu avec les surnageants de culture (PVA3 : surnageant de titre 1/6561, ascite de titre 1/656100 Tableau II).

- Test d'immunofluorescence :

Parmi les anticorps anti-NC, deux anticorps PVA3 et PVB1 ont été titrés en IFI (paragraphe IV. B. b.) contre une batterie de souches de laboratoire et de souches des rues, afin de connaître l'avidité de chaque anticorps et de choisir la dilution de travail éliminant les réactions non spécifiques.

Les hybridomes PVA3 et PVB1 réagissent de manière forte (Tableau VI et VII) aussi bien avec les deux souches de laboratoire (PV et ERA), qu'avec les deux souches françaises des rues. L'hybridome PVB1 réagit également bien sur les souches apparentées LAGOS-BAT (Nigéria) et DUVENHAGE. Il montre une faible affinité pour MOKOLA (Cameroun) qui disparaît après dilution au 1/300. L'hybridome PVA3 est par contre négatif sur les souches apparentées à la rage.

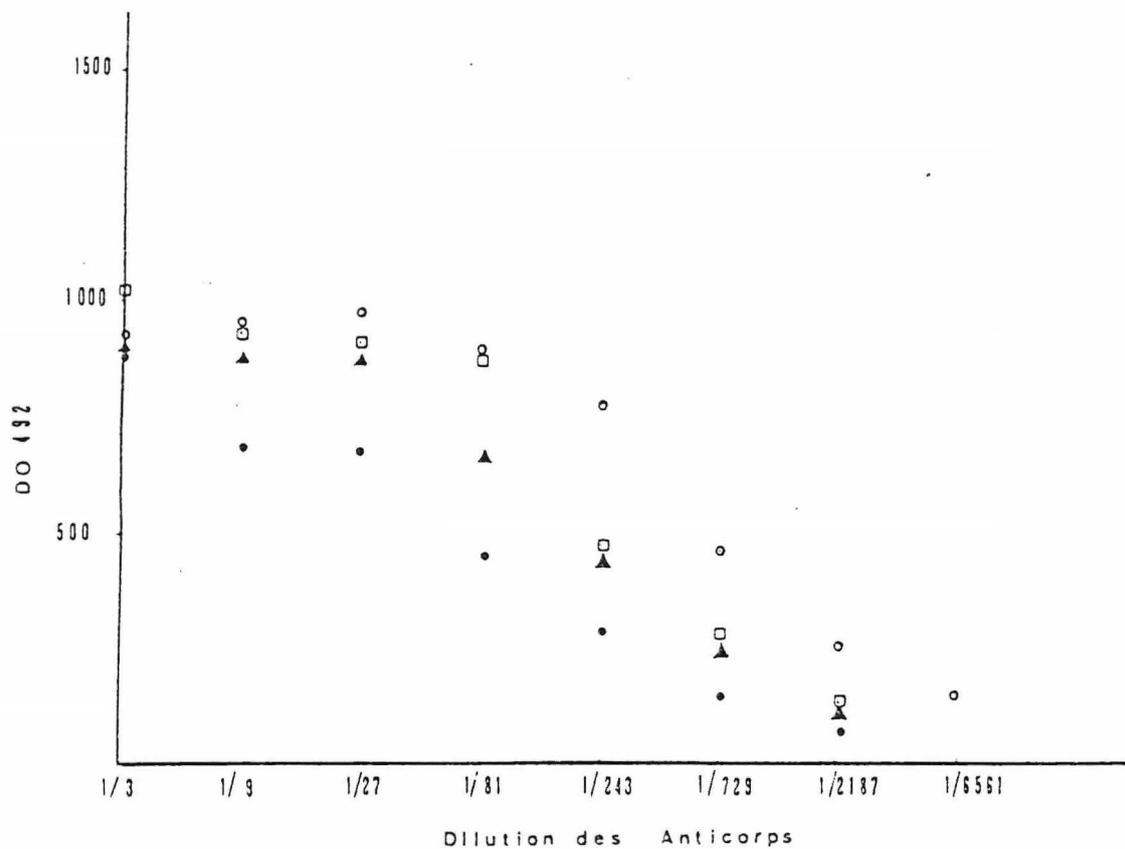


FIG. 3 Cinétique de réaction antigène anticorps en T.I.E. des surnageants des clones o--o PVA 3, □--□ PVA 2, Δ--Δ PVA 1, et ●--● PVA 5 vis à vis de la souche PV

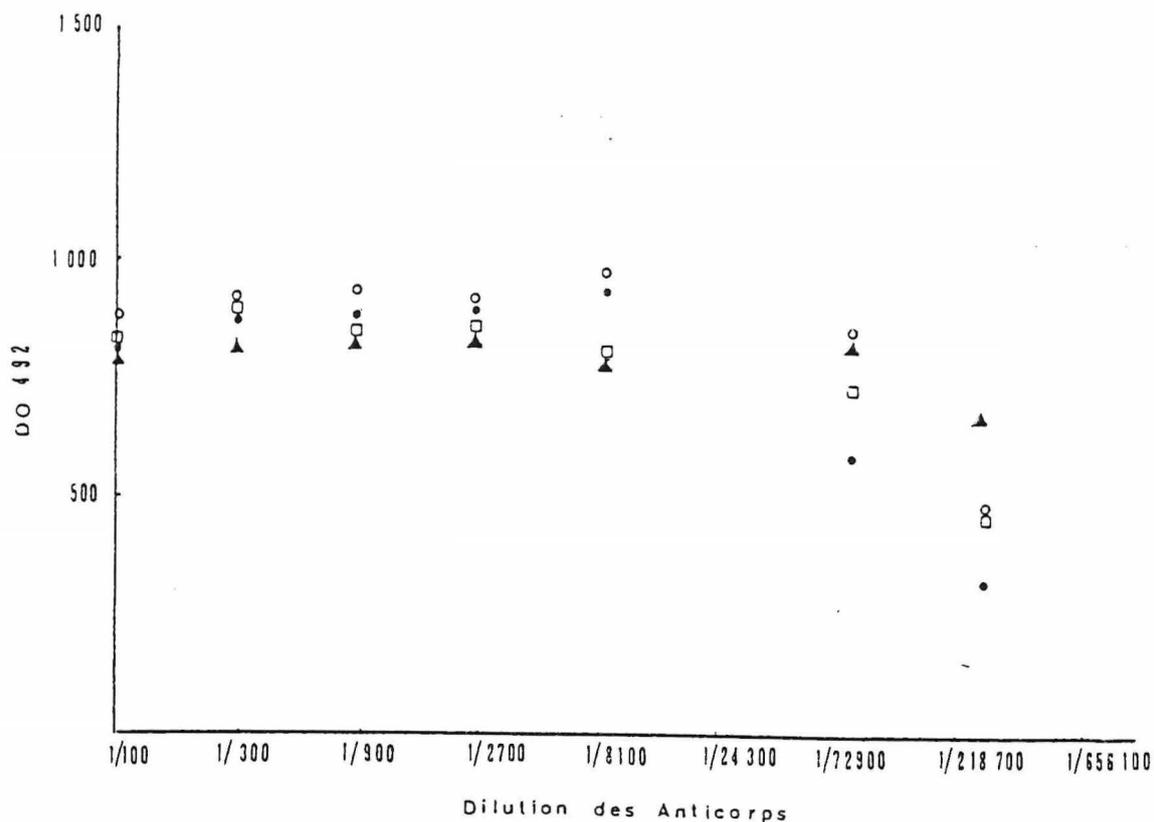


FIG. 4 Cinétique de réaction antigène anticorps en T.I.E. des ascites des clones o--o PVA 3, □--□ PVA 2, Δ--Δ PVA 1 et ●--● PVA 5 vis à vis de la souche PV

TABLEAU VI .ANTICORPS MONOCLONAL ANTINUCLEOCAPSIDE PVA3 :
 RESULTATS DU TITRAGE EN TEST D' IFI POUR LES SOUCHES
 DE LABORATOIRE ET DE SOUCHES DES RUES (IMPRESSIONS DE
 CERVEAUX) .

SOUCHES	DILUTION DE L'ANTICORPS					
	PUR	1/3	1/9	1/27	1/81	1/243
PV/BHK	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ERA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Renard (Fra.)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Chien (Fra.)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Mokola (Cam.)	0	0	0	0	0	0
Mokola (RCA)	0	0	0	0	0	0
Lagos-B. (Nig.)	0	0	0	0	0	0
Lagos-B. (RCA)	0	0	0	0	0	0
Duvenhage	0	0	0	0	0	0

pur = ascite à la dilution de travail 1/100

U = absence de fluorescence

+, ++, +++, = intensité croissante de fluorescence

TABLEAU VII. ANTICORPS MONOCLONAL ANTINUCLÉOCAPSIDE PVBl :
 RESULTATS DU TITRAGE EN TEST D'IFI POUR DES SOUCHES
 DE LABORATOIRE ET DE SOUCHES DES RUES (IMPRESSIONS DE
 CERVEAUX).

DILUTION DE L'ANTICORPS

SOUCHES	PUR	1/3	1/9	1/27	1/81	1/243
PV/BHK	+++	+++	+++	+++	+++	++
ERA ⁻	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Renard (Fra.)	+++	+++	++	++	++	++
Chien (Fra.)	+++	+++	+++	+++	++	++
Mokola (Cam.)	++	+	0	0	0	0
Mokola (RCA)	0	0	0	0	0	0
Lagos-B. (Nig.)	0	0	0	0	0	0
Lagos-B. (RCA)	+++	+++	+++	+++	++	++
Duvenhage	+++	+++	+++	+++	+++	+++

pur = ascite à la dilution de travail 1/100

0 = absence de fluorescence

+, ++, +++ = intensité croissante de fluorescence

G - Particularité des clones PVC et PVF.

Tous les clones PVC et PVF produisent des anticorps qui réagissent en TIE avec la souche homologue PV (Tableau II), cependant, ils restent négatifs ou très faiblement positifs avec les souches PV, CVS, ERA et MOKOLA en IFI (Tableaux III et IV).

L'hybridome PVC a une fluorescence anti-NC faible avec les souches CVS et MOKOLA (PVC3) et l'hybridome PVF, une fluorescence de membrane avec la souche PV, mais ne la neutralise pas. Il est négatif avec MOKOLA. La reconnaissance de l'antigène PV par ces deux hybridomes pourrait être non spécifique. En effet, le rappel i.v. avec la souche PV provient d'une culture cellulaire BHK 21 et les plaques du test immunoenzymatique sont sensibilisées par le virus propagé sur les mêmes cellules. Ces hybridomes ont donc été testés pour vérifier s'ils n'avaient pas une spécificité anticellulaire qui correspond aux protéines partagées par les cellules de rein de veau (l'injection primaire utilise PV propagé sur cellules de rein de veau) et les BHK 21.

Les surnageants des clones PVC3 et PVF5 et un sérum anti BHK 21 sont titrés en TIE tels quels ou après absorption, une nuit à 4° C sur cellules BHK 21 intactes ou sur cellules broyées.

Les résultats sont illustrés par le Fig. 5. On constate que le clone PVF5 présente une prozone qui n'existe plus en présence de BHK intactes ou broyées ; le pic est déplacé du 1/81 au 1/12 et s'accompagne d'une augmentation de la D.O. (BHK intactes). La D.O. du surnageant du clone PVC3 n'est pas perturbée par la présence de BHK intactes, mais est augmentée par la présence de BHK broyées ; il en est de même pour PVA1.

Le sérum anti-BHK 21 réagit de façon significative sur les plaques sensibilisées par PV propagées sur BHK 21, ce qui montre que la pureté du virus n'est pas totale.

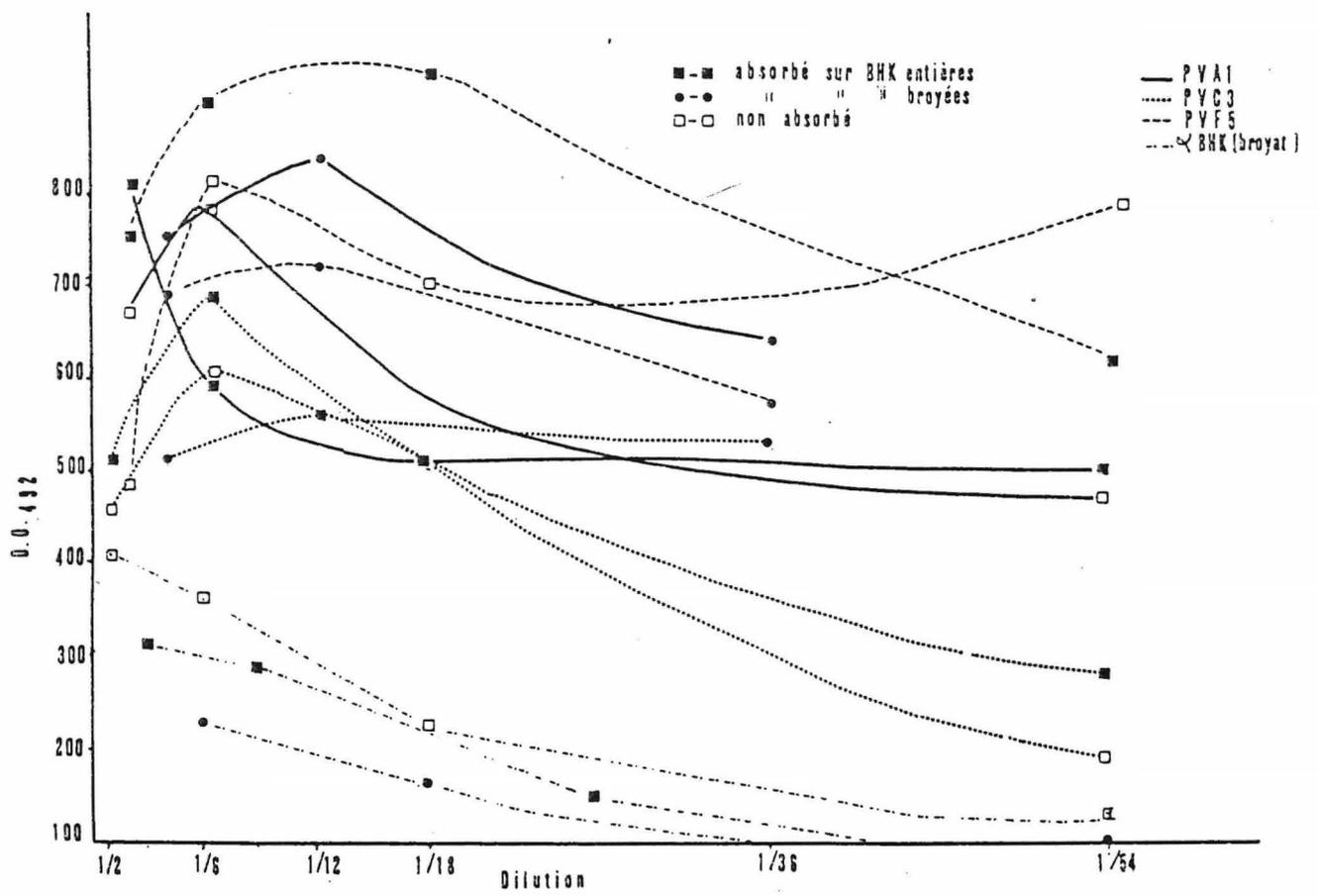


Fig.5 Titrage en T.I.E. du surnageant des clones PVA1, PVC3, et PVF5 absorbé ou non sur cellules BHK21 entières ou broyées.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'effet stimulateur précoce du rappel de virus vivant injecté par voie intra-veineuse est un point intéressant dans un protocole d'immunisation accéléré. La remontée du titre d'anticorps, aussi bien de la classe G que M qu'il engendre, permet de réaliser des fusions à partir de splénocytes sécréteurs dès le 10^e jour d'immunisation.

La comparaison des résultats de fusions obtenus avec les différents protocoles d'immunisation met en évidence, premièrement l'existence d'une phase d'éclipse durant laquelle aucun hybridome fonctionnel n'est obtenu ; la fusion ou la survie de cellules hybrides ne sont pas des événements aléatoires et seuls les plasmocytes stimulés très précocement ou très tardivement (les B mémoires) donnent naissance à des hybridomes spécifiques, deuxièmement, que les splénocytes sécréteurs d'IgG sont des partenaires préférentiels de fusion, ou ont une meilleure survie dans les conditions de l'expérience.

L'impossibilité qu'il y a de faire la distinction entre un splénocyte partenaire préférentiel de fusion, et un splénocyte favorisant l'obtention d'hybridomes viables, permet d'avancer deux hypothèses :

- les hybridomes fonctionnels obtenus à 10 et 75 jours proviennent de lymphocytes prélevés à un stade où l'efficacité de fusion est optimale et précède le maximum de sécrétion (Claflin et Williams, 1978 ; Laskov et al, 1978).
- l'agent de fusion intervient en sélectionnant un type de cellules B donné (Fazekas de St Groth and Scheidegger, 1980).

Parmi les anticorps monoclonaux obtenus, quatre hybridomes sécrètent des anticorps dirigés contre la NC du virus homologue PV. Sur la base de leur réactivité avec les souches de rage fixe CVS, ERA, les souches de rues, trois souches apparentées à la rage, trois groupes ont été définis. Les anticorps PVA3 et PVG4 se sont confirmés comme étant spécifiques des souches rabiques. Outre leur réactivité avec les souches de rage, PVB1 et PVD3 décèlent des différences antigéniques au sein du groupe de virus d'origine Africaine (MOKOLA, DUVENHAGE, et LAGOS-BAÏ). PVB1 est positif avec MOKOLA (Cameroun)

LAGOS-BAT (RCA) et DUVENHAGE, PVD3 est positif avec MOKOLA (RCA, Cameroun). Le titrage de l'ascite PVBl en IFI permet d'affiner sa réactivité vis à vis des souches virales étudiées et d'éliminer sa positivité avec la souche MOKOLA (Cameroun). La dilution de travail 1/9000^e est confirmée par le titrage en TIE (résultats non présentés).

Les résultats obtenus par les tests de neutralisation et d'IFI ont permis de définir 7 anticorps monoclonaux comme étant anti-G.

Pour les hybridomes PVE et PVK, il existe une bonne corrélation entre les deux tests, en regard des souches fixes PV, CVS et ERA.

Certains clones des hybridomes PVI, PVQ, PVO et PVP ne neutralisent pas, par contre, CVS.

L'hybridome PVF, bien que positif en IFI et en TIE, ne neutralise pas le virus homologue. L'hypothèse d'une fausse réactivité de ce clone (ainsi que celle de PVC) a pu être écartée par l'absorption des anticorps sur cellules BHK 21, sachant qu'il existe des contaminations cellulaires sur le support de polystyrène du TIE qui pourraient être l'actine (Naito et Matsumoto, 1978).

L'incapacité de PVF à neutraliser le virus homologue appelle trois interprétations :

- le TIE pourrait favoriser l'accessibilité des épitopes absents sur les membranes de cellules infectées.
- l'hybridome PVF serait spécifique, non de la protéine G, mais de la protéine M virale.
- PVF est un anticorps spécifique de G, mais non neutralisant.

En ce qui concerne la souche apparentée à la rage MOKOLA, à l'inverse des souches rabiques, il n'existe pas de corrélation entre les résultats des tests d'IFI et de neutralisation, sauf pour PVK où les deux tests restent négatifs.

Les hybridomes PVE, PVF et certains clones de PVI et PVQ, neutralisent MOKOLA, mais le test d'IFI réalisé à 48 h d'incubation reste négatif. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'assemblage tardif, postérieur à 48 h, de la NC et de la G du virus, au niveau de la membrane cellulaire.

Ainsi la G n'est pas encore en position membranaire et n'est pas révélée par test d'IFI.

D'autre part, cette divergence pourrait être, une fois encore, expliquée par une différence de présentation des épitopes exisants sur les cellules infectées ou sur le virus.

Ces deux exemples illustrent l'intérêt qu'il y a d'utiliser pour la caractérisation des anticorps monoclonaux, non pas un test mais plusieurs lorsque ceux-ci sont disponibles.

Il faut insister sur l'importance pratique de tels anticorps monoclonaux dans le diagnostic de routine. L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-NC couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine pourrait avantageusement remplacer les globulines de lapin (obtenues avec des nucléocapsides du virus PV) actuellement utilisées. Un "kit" pourrait être constitué par les anticorps produits par deux hybridomes (PVA et PVG) qui peuvent différencier les virus de rage des virus apparentés à la rage, auxquels on pourrait joindre l'anticorps produit par PVD qui reconnaît les virus de rage et MOKOLA. Cette technique est facilement utilisable sur les impressions de cerveaux effectuées pour les diagnostics de routine. Il est évident que la sensibilité et la stabilité apportées par de tels réactifs sont appréciables dans des tests standardisés.

REFERENCES

- ABELSETH, M.K., (1964). - An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. *Canadian Veterinary Journal* 5, 279-286.
- ASKONAS, B.A., (1982). - The application of monoclonal antibodies to studies of virus diseases. Review papers. Properties of monoclonal antibodies produced by hybridoma technology and their application to study of diseases. *Hybridoma technology II. UNDP/WORLD BANK/WHO. Geneva - Switzerland.*
- ATANASIU, P., SAVY, V. et PERRIN, P., (1977). a. - Epreuve immunoenzymatique pour la détection rapide des anticorps antirabiques. *Annales de Microbiologie (Institut Pasteur)*, 128 A, 489-498.
- ATANASIU, P., TSIANG, H., RECLARD, P., AIGUILLON, F., LAVERGNE, M., ADAMO-VITCZ, Ph., (1977). b. - Zonal centrifuge purification of human rabies obtained on bovine fetal kidney cells. *Biologicals results Joint WHO/IABS Symposium (Rabies III), Marburg/Lahn 1977. Developments in Biological Standardization* 40, 35-44 (S. Karger Basel).
- ATANASIU, P., PERRIN, P. et DELAGNEAU, J.F., (1980). - Use of an enzyme immunoassay with Protein A for rabies antigen and antibody determination. *Developments in Biological Standardization* 46, 207-215, (S. Karger, Basel).
- CLAFLIN, L. and WILLIAMS, K., (1978). - Mouse myeloma spleen cell hybrid : enhanced hybridization frequencies and rapid screening procedures in ref. MELCHERS and al, 1978.
- COONS, A.H. and KAPLAN, M.H., (1950). - Localization of antigen in tissue cell II : improvement in method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine*, 91, 1-13.
- EY, P.L., PROWSE, S.J. and JENKIN, C.R., (1978). - Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein-A-Sepharose. *Immunology* 15, 429.

- FAZEKAS de St GROTH, S. and SCHEIDEGGER, D., (1980). - Production of monoclonal antibodies : strategies and tactics. *Journal of Immunological Methods*, 35, 1-21.
- FLAMAND, A., WIKTOR, T.J. and KOPROWSKI, H., (1980). - Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus proteins.
I. - The nucleocapsid protein, *Journal of general Virology*, 48, 97-104.
II. - The glycoprotein, *Journal of general Virology*, 48, 105-109.
- GALFRÉ, G., MILSTEIN, C. and WRIGHT, R., (1979). - Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion in mouse IgG. *Nature*, 277, 131-133.
- GOLDWASSER, R.A. and KISSLING, R.E., (1958). - Fluorescent antibody staining of street and fixed virus antigen. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 98, 219-223.
- KISSLING, R.E., (1958). - Growth of rabies virus in non nervous tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 98, 223-225.
- KÖHLER, G. and SCHULMAN, M.J., (1978). - Cellular and molecular restrictions of lymphocyte fusion in ref. MELCHERS and al, (1978).
- KOPROWSKI, H. and WIKTOR, T.J., (1980). - Monoclonal antibodies against rabies virus, p. 335-351. In KENNETH, R.H. and Mc KEAN, T.J. (ed). *Monoclonal antibodies hybridomas : a new dimension in biological analysis*. Plenum Publishing Corp., New York.
- LAFON, M., WIKTOR, T.J. and MacFARLAN, R.I., (1983). - Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein : analysis with monoclonal antibodies. *Journal of general Virology*, 64, 843-851.
- LASKOV, R., KIMM, K.J. and ASOFSKI, R., (1978). - Induction of IgM secretion by fusing murine B lymphoma with myeloma cell in ref. MELCHERS and al, (1978).
- LEPINE, P. et GAMET, A., (1974). - Sur l'évolution des virus fixes et la souche Pasteur en particulier. *International symposium on rabies (II)*, Lyon 1972. *Symposia Series in Immunological Standardization*, 21, 60-66 (Karger, Basel).

- LITTLEFIELD, J.W., (1964). - Selection of hybrids from mating of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science* 145, 709.
- MELCHERS, F., POTTER, M. and WARNER, N.L., (1978). - Lymphocyte hybridomas. *Current topics in Microbiology and Immunology*, vol. 81, Springer Verlag, Berlin.
- NAITO, S. and MATSUMOTO, S., (1978). - Identification of cellular actin with the rabies virus. *Virology* 91, 151-163.
- PONTECORVO, G., (1975). - Production of mammalian somatic cell hybrids by mean of polyethylène glycol (PEG) treatment. *Somatic Cell Genetics* 1, 397.
- SALUZZO, J.F., ROLLIN, P.E., DAUGUET, C., DIGOUTTE, J.P., GEORGES, A.J. et SUREAU, P., (1984). - Premier isolement du virus Mokola à partir d'un rongeur (*Lophuromys sikapusi*). *Annales de Virologie (Institut Pasteur)*, 135 E, 57-66.
- SCHULMAN, M., WILDE, C.D. and KÖHLER, G., (1978). - A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276, 269.
- SOKOL, F., KUWERT, E., WIKTOR, T.J., HUMMELER, K. and KOPROWSKI, H., (1968). - Purification of rabies virus grown in tissue culture. *Journal of Virology* 2, 836-849.
- SUREAU, P., ROLLIN, P.E. and WIKTOR, T.J., (1983). - Epidemiologic analysis of antigenic variations of street rabies virus : detection by monoclonal antibodies. *American Journal of Epidemiology*, 117.5, 605-609.
- STOKER, M.G.P. and MacPHERSON, I.A., (1961). - Studies of transformation of hamster cells by polyoma virus *in vitro*. *Virology* 14, 359-370.
- VOLLER, A., BIDWELL, D.E., HULD, G. and ENGVALL, E., (1974). - A microplate method of ELISA and it's application to malaria. *Bulletin WHO* 51, 209-211.
- WIKTOR, T.J., DIETSCHOLD, B., LEAMNSON, R.N. and KOPROWSKI, H., (1977). - Induction and biological properties of defective interfering (D.I.) particles of rabies virus. *Journal of Virology* 21, 626-634.

- WIKTOR, T.J. and KOPROWSKI, H., (1978). - Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization : detection of antigenic variants. *Proceedings of the National Academy of Science of USA.*, 75, 3938-3942.
- WIKTOR, T.J. and KOPROWSKI, H., (1980). - Antigenic variants of rabies virus. *Journal of Experimental Medecine* 152, 99-112.
- WIKTOR, T.J., FLAMAND, A. and KOPOROWSKI, H., (1980). Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differenciation of rabies and rabies related virus. *Journal of Virological Methods* 1, 33-44.