PROGRAMME PRIORITAIRE DE COOPÉRATION ENTRE LE MAROC ET LA FRANCE

Appui Scientifique et Technique au Laboratoire National de Productions de Vaccins Vétérinaires

---

VOLUME 2 : ANNEXES

F. BERTIN
J.P. DOLET

ANNEE 1988

PROGRAMME PRIORITAIRE DE COOPÉRATION ENTRE LE MAROC ET LA FRANCE

Appui Scientifique et Technique au Laboratoire National de Productions de Vaccins Vétérinaires

---

VOLUME 2 : ANNEXES

F. BERTIN

J.P. DOLET

ANNEE 1988

ROYAUME DU MAROC

Ministère de l'Agriculture
et de la Réforme Agraire

SOCIETE BIOPHARMA

DOSSIER D'APPEL D'OFFRES

Pour la fourniture et l'installation des équipements et matériels nécessaires au fonctionnement d'une unité de production de vaccin antirabique dans le cadre de l'extension du Laboratoire National de Production de Vaccins Vétérinaires à RABAT

Financement : Le projet est financé par la Communauté Economique Européenne.

Projet : S E M 01 / 204 / 017

Convention de financement : 032 / MAR

Appel d'offre n° :

Le présent dossier d'appel d'offres est composé de :

- La partie A avec en annexe le modèle de soumission
- La partie B
- L'annexe technique, comprenant
  - . La description des équipements et matériels
  - . Le cadre de bordereau des prix et de détail estimatif
  - . Le plan du laboratoire.

AVIS D'APPEL D'OFFRES N°

Lancé par le ROYAUME DU MAROC (Ministère de l'Agriculture et de la Réforme Agraire - Société BIOPHARMA)

Le projet est financé par la COMMUNAUTE ECONOMIQUE EUROPEENNE

N° LOCAL DE L'APPEL D'OFFRES = 1/CEE/88

1.- PARTICIPATION

La participation à la concurrence est ouverte à égalité de conditions à toutes les personnes physiques et morales du ROYAUME DU MAROC et des Etats Membres de la Communauté Economique Européenne.

2.- O B J E T

Fourniture et installation en neuf lots des équipements et matériels nécessaires au fonctionnement d'un laboratoire de production de vaccin contre la rage

Lot. N°1 : Autoclaves et Four Pasteur

Lot. N°2 : Appareils de production et de conservation du froid

Lot. N°3 : Appareils de laboratoire divers et Petit matériel

Lot. N°4 : Equipement d'une chambre froide et de 2 chambres étuves

Lot. N°5 : Verrerie de laboratoire

Lot. N°6 : Matériel de filtration et récipients inox

Lot. N°7 : Appareillage à flux laminaire

Lot. N°8 : Produits chimiques

Lot. N°9 : Matériel fongible ou à usage unique

.../...

3.- ACQUISITION DU DOSSIER D'APPEL D'OFFRES

Le dossier d'appel d'offres établi en français peut être obtenu auprès de :

Société de Production Biologiques et Pharmaceutique
Vétérinaires - "BIOPHARMA"
Km2 - route de Casablanca - BP 4569 - RABAT
Tx : 320 52 M

Prix du dossier = 50 ECU
ou : 500 DH

Modalité de paiement : Chèque bancaire à l'ordre de la Société BIOPHARMA

4.- CONSULTATION DU DOSSIER D'APPEL D'OFFRES

Les documents du présent appel d'offres peuvent être consultés aux adresses ci-aprés.

5.- LES SOUMISSIONS

devront parvenir au plus tard le 5 SEPT. 1988 à 12 Heures, heure locale à Monsieur le Directeur de BIOPHARMA

Km2 - Route de CASABLANCA - BP 4569
RABAT AKKARI - MAROC

Elles seront ouvertes à RABAT le 8 SEP. 1988 dans les locaux de BIOPHARMA à 10H 00 heure locale

- Services d'information des Communautés Européennes :

* D - 5300 Bonn, Zitelmannstrasse 22
* NL - La Haye, Lange Voorhout 29
* L - Luxembourg, Chambre de Commerce - 7, Rue Alcide de Gasperie, B.P. : 1503
* F - 75782 Paris Cedex 16, 61 Rue des Belles Feuilles
* I - 00187 - Rome, Via Poli, 29
* DK - 1004 Copenhague K, Gammel Torv 4, Postbox 144
* UK - Londres W8 4 QQ, Kensington Palace Gardens
* IRL - Dublin, 29 Merrion Square
* GR - Athènes, 2 Vassilissis Sofias
* E - Calle de Serrano, 41, 5^{a} planta MADRID 1
* P - Centro Europeu Jean Monnet, Rua do Salitre 56 LISBOA 1200

ROYAUME DU MAROC

Ministère de l'Agriculture
et de la Réforme Agraire

SOCIETE BIOPHARMA

APPEL D'OFFRES

POUR LA FOURNITURE ET L'INSTALLATION DES EQUIPEMENTS
ET MATERIELS D'UN LABORATOIRE DE PRODUCTION ET DE
CONTROLE DE VACCINS VETERINAIRES.

****

UNITE DE PRODUCTION DE VACCIN ANTIRABIQUE

ANNEXE A LA PARTIE A

- Modèle de soumission -

Appel d'Offres n° , lot n°

SOUMISSION

Je soussigné (2) .....
(nom et prénoms, qualité et adresse), agissant au nom et pour le compte de
..... (3) .....
dont le siège social est à ..... (4)
....., inscrite au registre du commerce de .....
sous le n° .....

- après avoir pris connaissance de toutes les pièces du dossier d'appel d'offres n° ....., lot n° ..... (parties A et B ainsi que l'annexe technique), pour la FOURNITURE ET L'INSTALLATION, A RABAT, DES EQUIPEMENTS ET MATERIELS NECESSAIRES AU FONCTIONNEMENT D'UN LABORATOIRE DE PRODUCTION DE VACCIN CONTRE LA RAGE.

- après avoir étudié personnellement toutes les conditions liées au marché et avoir apprécié en toute connaissance de cause la nature des fournitures et prestations à exécuter,

- Me soumets et m'engage à exécuter ces fournitures et prestations dans un délai de (*) mois à compter de la date de notification de la commande pour la somme forfaitaire et non révisable de .....
..... (5), selon décomposition qui suit :
..... (prix A) (6)
correspondant à la fourniture franco destination à pied d'oeuvre de l'ensemble des équipements et matériels prévus et .....
..... (prix B) (6)
correspondant aux opérations de montage, essais et mise en service desdits équipements et matériels.

Je joins à la présente soumission les références, documentations, listes de pièces détachées, plans, etc... prescrits par le dossier d'appel d'offres.

(*) Le délai maximum est indiqué à l'art. VII.2 partie A.

.../...

Je m'engage à maintenir le montant de mon offre pendant un délai de trois mois à compter de la date limite de remise des offres.

Je demande que les sommes dues par l'administration me soient payées en .....(monnaie de la soumission) au crédit du compte n° ..... ouvert au nom de ..... (7) ..... chez la banque ....

à ....., le .....

Signature

---

(1) - Il sera présenté une soumission par lot.

(2) - Lorsqu'il y aura plusieurs entreprises soumissionnant conjointement et solidairement, elles devront mettre :

"Nous soussignés"

"Nous soumettons et nous engageons"

(3) - Raison sociale complète de l'entreprise ou société.

(4) - Adresse complète et détaillée (N°, Rue, Ville, Pays etc...)

(5) - Préciser la monnaie et indiquer le montant en chiffres et en lettres. L'offre peut être libellée :

soit, dans la monnaie du Pays qui lance l'appel d'offres,

soit, dans la monnaie du Pays du domicile ou du siège social du soumissionnaire,

soit, dans la monnaie du Pays producteur de la fourniture,

soit, en unités de compte européennes (E.C.U.).

(6) - cf. art. XI, partie A.

(7) - Si la soumission est libellée en ECU, il y a lieu d'indiquer la monnaie d'un Etat membre dans laquelle le soumissionnaire désire être payé, le paiement s'effectuant sur la base de la contrevaleur de l'ECU le jour précédant le paiement.

ROYAUME DU MAROC

Ministère de l'Agriculture
et de la Réforme Agraire

SOCIETE BIOPHARMA

APPEL D'OFFRES

POUR LA FOURNITURE ET L'INSTALLATION DES EQUIPEMENTS ET MATERIELS D'UN LABORATOIRE DE PRODUCTION ET DE CONTROLE DE VACCINS VETERINAIRES.

****

UNITE DE PRODUCTION DE VACCIN ANTIRABIQUE

PARTIE A

Appel d'offres N° lancé par le Royaume du Maroc (Ministère de l'Agriculture et de la Réforme Agraire, Société BIOPHARMA, pour un projet financé par la Communauté Economique Européenne.
N° local de l'appel d'offre : 1/CEE/88.

Concerne :

Fourniture et installation, en neuf lots, des équipements et matériels nécessaires au fonctionnement d'un laboratoire vétérinaire à RABAT, en vue de la production de vaccin contre la rage.

Le présent appel d'offres comporte des parties A et B ainsi qu'une annexe technique.

La numérotation en chiffres romains de la partie A (clauses particulières) correspond à celle en chiffres arabes indiquée à la partie B (clauses générales des appels à la concurrence concernant les marchés de fourniture financés par la Communauté Economique Européenne).

Le cas échéant, les dispositions particulières des articles de la partie A complètent, précisent, modifient les dispositions contenues aux articles correspondants de la partie B ou y dérogent.

Dans le silence de la partie A, les dispositions de la partie B sont de stricte application.

Les parties A et B réunies, l'annexe technique et les modificatifs éventuels, constituent l'ensemble des clauses et dispositions relatives à l'établissement des offres, à la passation des commandes et à l'exécution des commandes faisant suite à cet appel d'offres.

Projet : SEM 01 / 204 / 017
Convention de Financement : 032 / MAR.

.../...

OBJET

Fourniture et installation en neuf lots des équipements et matériels nécessaires au fonctionnement d'un laboratoire de production de vaccin contre la rage

Lot. N°1 : Autoclaves et Four Pasteur

Lot. N°2 : Appareils de production et de conservation du froid

Lot. N°3 : Appareils de laboratoire divers et Petit matériel

Lot. N°4 : Equipement d'une chambre froide et de 2 chambres étuves

Lot. N°5 : Verrerie de laboratoire

Lot. N°6 : Matériel de filtration et récipients inox

Lot. N°7 : Appareillage à flux laminaire

Lot. N°8 : Produits chimiques

Lot. N°9 : Matériel fongible ou à usage unique

CLAUSES PARTICULIERES - PARTIE A

I.- PARTICIPATION

La participation à la concurrence est ouverte à égalité de conditions à toutes les personnes physiques et morales du Royaume du MAROC et des Etats Membres de la Communauté Economique Européenne.

III.- O B J E T

Fourniture, montage, et/ou installation, en 9 lots, des équipements et matériels nécessaires au fonctionnement d'un laboratoire vétérinaire en vue de la production du vaccin contre la Rage. (Selon le détail joint ci-contre)

Mise en place, montage et/ou installation

Tous les équipements et matériels doivent être livrés et présentés à la réception en état d'utilisation. Des notices détaillées d'utilisation en Français devront accompagner tous les appareils.

Il est donc bien entendu que toutes les opérations précédent la présentation des fournitures en vue de leur réception (déballage, mise en place, fixation, branchement, montage, mise au point, essais, mise en service, etc...), sont à la charge du fournisseur. Ces prestations sont, pour la suite des présentes, définies par le vocable "montage".

La description détaillée des équipements et matériels demandés est donnée dans l'Annexe technique.

Formation du personnel d'exploitation et d'entretien

Il appartient aux attributaires de tous les lots d'assurer la formation sur place du personnel chargé de l'exploitation et de l'entretien des équipements. Cette formation se fera au cours de l'installation et/ou du montage du matériel considéré. Son coût sera compris dans les prix B (forfait pour montage - cf. art. XI ci-après). Dans une note séparée jointe à son offre, le soumissionnaire indiquera comment il compte organiser cette formation, en spécifiant sa durée, le profil professionnel et le nombre de techniciens à fournir par l'administration.
Cette formation ne concerne pas les lots 4, 5, 8 et 9.

.../...

III.3 - De plus, pour chaque appareil, plusieurs options peuvent être proposées.

III.4.- Pièces détachées :

Pour tous les lots les soumissionnaires présenteront, sur la base de leurs propres expériences, une liste chiffrée de pièces de rechange dont ils recommandent l'acquisition pour un fonctionnement normal de deux ans effectifs

III.5.- L'Administration se réserve le droit de modifier les listes des pièces de rechange présentées par le soumissionnaire, de ne pas commander ou de n'en commander qu'une partie, étant entendu que le soumissionnaire reste lié par sa proposition chiffrée pour toutes quantités qui seraient commandées dans le cadre du marché.

III.6.- Si l'Administration entend commander des pièces de rechange, la liste exacte sera fixée dans l'ordre de service n°1. (Lettre de marché).

V.- VARIATIONS DE QUANTITES

V.1.- La commission d'appel d'offres se réserve le droit d'éliminer un ou plusieurs postes par lots, dans la limite de 30 % du coût total.

V.2.- Au delà de ces 30 %, le prix du matériel retenu sera augmenté de 10 %.

VII.- LIEU DE DESTINATION ET DELAI DE LIVRAISON

VII.1- Les équipements et matériels faisant l'objet du présent appel d'offres sont à livrer et à monter au sens de l'article III de la présente partie A, dans le Laboratoire National de Production de Vaccins Vétérinaires BIOPHARMA - Tx n° 320 52 - Tel : 216-92/254-54, situé à RABAT, route de CASABLANCA - Km 2.

VII.2- Le délai d'exécution maximum (montage et essais de bon fonctionnement compris) est fixé à 4 mois pour tous les lots.

Le fournisseur peut proposer des délais inférieurs.

.../...

IX.- RECEPTIONS

IX.1 - L'organisme chargé de réceptionner provisoirement et définitivement les fournitures et équipements est la Société BIOPHARMA du Ministère de l'Agriculture et de la Réforme Agraire du Royaume du Maroc, désigné par le vocable "administration".

La C.C.E. sera représentée aux réceptions par son Délégué au Maroc ou la représentant de ce dernier.

IX.2 - La réception provisoire sera effectuée en deux fois :

- une première réception quantitative lors de l'arrivée des équipements à pied d'oeuvre ;
- une deuxième réception technique, valant réception provisoire complète, portant sur le matériel en état d'exploitation, c'est-à-dire après montage et essais de bon fonctionnement.

X.- GARANTIE - SERVICE APRES VENTE

X.1.- Un an, à compter de la réception provisoire complète.

X.2.- Les dispositions de l'article 10.2, partie B, sont d'application pour tous les lots et tous les matériels composant les lots.

A ce titre, le soumissionnaire doit joindre à sa soumission :

- une note indiquant les conditions dans lesquelles seront assurées les réparations autres que celles résultant d'une usure normale pendant le délai de garantie.
- une note exposant dans quelles conditions sera assuré le service après vente des différentes catégories de matériel, en particulier les délais moyens de livraison des pièces de rechange qui ne seront pas incluses dans le marché relatif au présent appel d'offres; cette note doit décrire l'organisation du service après vente, laquelle constituera un critère d'appréciation lors de la comparaison des offres.

X.3 - Les soumissionnaires de tous les lots présenteront, en plus des notes exigées en application des dispositions du paragraphe 2 ci-dessus, un projet de contrat chiffré d'inspection et de service annuels.

.../...

XI.- CALCUL DES PRIX UNITAIRES

XI.1.1.- Les prix unitaires et globaux seront obligatoirement décomposés comme suit :

- Prix A : prix franco destination à pied d'oeuvre à RABAT,
- Prix B : forfait pour montage.

XI.1.2.- Les prix unitaires et globaux seront obligatoirement décomposés comme suit :

- Prix A : prix franco destination à pied d'oeuvre à RABAT,
- Prix B : forfait pour montage.

XI.2.- Nonobstant les décompositions indiquées ci-dessus, la somme des prix A et B reste ferme.

Les produits chimiques et biologiques ainsi que le petit matériel ne feront l'objet que d'un seul prix A. (Lots 8 et 9)

XII. FISCALITE

XII.1.- Le soumissionnaire annexera une note détaillée donnant le calcul de l'éventuelle fiscalité interne qui, d'après lui, sera appliquée aux fournitures proposées dans sa soumission, de façon à permettre un contrôle par la commission d'appel d'offres.

XII.2.- Les fournitures concernant ce marché sont exemptées des droits et taxes à l'importation, et fiscalité équivalente dans les conditions fixées par la réglementation marocaine en vigueur en la matière.

XII.3. - La contribution de la Communauté Economique Européenne au financement du projet ne concerne que le coût hors taxes du projet. La Société BIOPHARMA prendra en charge tous impôts et taxes pour lesquels aucune exonération n'est prévue par la législation marocaine.

XIII.- PRESENTATION DES OFFRES

XIII.1.- Langue française (1 original et 2 copies marquées comme telles)
Les offres seront présentées en double enveloppe.

XIII.2.- Mr. le Directeur de la Société BIOPHARMA - BP 4569 - Km2 route de CASABLANCA - RABAT - AKKARI - Royaume du Maroc.

XIII.3.- Réponse à l'appel d'offres n° 1/CEE/88 du 5/09/88 pour la fourniture et le montage des équipements et matériels d'un laboratoire de production et de contrôle de vaccin contre la Rage. A n'ouvrir qu'en séance d'ouverture des plis par le président de la commission d'Appel d'Offres".

XIII.4.- 5 SEPT. 1988, à 12 H00 heure locale .

XIV.- CONTENU DE L'OFFRE

XIV.2.- L'offre de prix proprement dite sera présentée pour chacun des lots intéressant le soumissionnaire sous forme d'une soumission établie conformément au modèle joint à la présente partie A à laquelle sera annexé, dûment complété et signé, le bordereau de prix et le détail estimatif également établi sur la base du cadre joint à l'annexe technique. Le soumissionnaire joint également à son offre tout autre document exigé par l'annexe technique ou par tout autre document du dossier d'appel d'offre.

XVI.- DUREE DE VALIDITE DES OFFRES

Par dérogation à l'article 16 partie B, la période d'engagement du soumissionnaire est portée à 90 jours.

XVII.- OUVERTURE DES OFFRES

A RABAT, le 8 SEP.1988 à 10 heures locales, en séance publique, dans les bureaux de la Société BIOPHARMA - Km2 - Route de CASABLANCA RABAT.

XVIII.- COMPARAISON DES OFFRES

Ces taux peuvent être obtenus auprès de la délégation de la CCE à RABAT ou auprès de la Direction Générale VIII Service APPEL D'OFFRES (VIII-E-3) , 200 rue de la Loi, 1049 BRUXELLES.

.../...

XX.- ECHELONNEMENT DES PAIEMENTS

Les dispositions de l'article 20, partie B, sont d'application aux conditions particulières ci-après, la nomenclature des prix se référant aux dispositions de l'article XI, 1.2 ci-avant.

XX.1.- 30 % du prix A

XX.2.- 30 % du prix A

XX.3.- 15 % du prix A et 30 % du prix B après la réception provisoire quantitative (cf. art. IX.2),

15 % du prix A et 60 % du prix B après la réception provisoire complète (cf. art. IX.2),

XX.4.- 10 % des prix A et B.

XXI.- MODALITES DE PAIEMENT

XXII.1.- Monsieur le Ministre des Finances au Royaume du MAROC-RABAT Ordonnateur National des marchés financés par la C.E.E.

XXII.3.- L'introduction des documents auprès de l'Ordonnateur National se fera par l'intermédiaire du Directeur de la Société BIOPHARMA - BP. 4569 - RABAT - AKKARI - MAROC

XXII.3.3.- pour tous les paiements de 15 %, les factures et les pièces annexées en 5 exemplaires.

XXII.4.- Les dispositions de l'article 22.4. sont complétées par les suivantes :

- L'adresse dont il fait mention à cet article est la suivante :
  Mr. le Chef de la Délégation de la Commission des Communautés Européennes au Royaume du Maroc - B.P. 1302 - RABAT.

- Copie de toute correspondance (y compris les factures) échangée entre les parties contractantes doit être envoyée en ampliation à cette adresse.

XXIII. - REGLEMENTATION

La législation marocaine.

.../...

XXV.- ACQUISITION DU DOSSIER D'APPEL D'OFFRES

Le dossier d'appel d'offres établi en français peut être obtenu auprès de :

SOCIETE BIOPHARMA Km2 - Route de CASABLANCA
B.P. 4569 - RABAT-AKKARI - MAROC

Prix du dossier : 500 DH ou 50 ECU

Modalités de paiement : par chèque de banque à joindre à la demande et établi à l'ordre de :

SOCIETE BIOPHARMA

Les dossiers d'appel d'offres peuvent être consultés aux adresses indiquées à l'article 25.

CLAUSES GENERALES

des appels à la concurrence concernant
les marchés de fournitures
financés par la Communauté Economique Européenne

PARTIE B

des appels d'offres

Une partie A distincte comportant les clauses particulières est établie pour chaque appel à la concurrence. Cette partie A, complétée par la description technique des prestations (annexe technique), et la présente partie B constituent le dossier d'appel d'offres complet.

SOMMAIRE

ART.		Page
1.-	Participation	1
2.-	Origine	1
3.-	Objet	1
4.-	Fractionnement	2
5.-	Variations de quantités	2
6.-	Emballage - Marquage	2
7.-	Lieu de destination et délai de livraison	2
8.-	Pénalités de retard	3
9.-	Réceptions	3
10.-	Garantie - service après vente	4
11.-	Calcul des prix	4
12.-	Fiscalité	5
13.-	Présentation des offres	6
14.-	Contenu de l'offre	6
15.-	Monnaie de l'offre et du paiement	7
16.-	Durée de validité des offres	8
17.-	Ouverture des offres	8
18.-	Comparaison des offres	8
19.-	Commandes	8
20.-	Echelonnement des paiements	8
21.-	Caution	10
22.-	Modalités des paiements	10
23.-	Réglementation	11
24.-	Arbitrage	11
25.-	Acquisition du dossier d'appel d'offres	11

Annexe : Modèle de la caution 12

1. - PARTICIPATION

La participation à la concurrence est ouverte à égalité de conditions à toutes les personnes physiques et sociétés relevant du domaine d'application du Traité instituant la Communauté Economique Européenne (CEE) et à toutes les personnes physiques et sociétés de l'Etat bénéficiaire.

2. - ORIGINE

Les fournitures offertes doivent obligatoirement être originaires de la CEE ou de l'Etat bénéficiaire.

3. - O B J E T

3.1.- Les fournitures offertes doivent être neuves. Les caractéristiques mentionnées dans la description des fournitures, objet de l'appel d'offres, sont données à titre indicatif.

3.2.- Toute fourniture fonctionnellement équivalente, similaire ou supérieure et adaptée aux conditions tropicales d'utilisation ainsi qu'au travail prévu dans le pays destinataire peut être proposée.

3.3.- Une fourniture dont les dimensions se rapprochent le plus possible de celles indiquées peut être proposée.

3.4.- S'il est prévu à l'article III.4 de la partie A que les fournitures, objet de l'appel d'offres, sont à livrer avec un lot individuel ou global de pièces de rechange dont la valeur est exprimée en pourcentage par rapport à la valeur de la fourniture proprement dite, le soumissionnaire joindra à son offre une liste de ces pièces de rechange établie selon ses expériences professionnelles en tenant compte du lieu d'utilisation.

3.5.- La liste des pièces de rechange doit indiquer les prix unitaires de ces pièces, calculés selon les dispositions figurant à l'article 11 ci-après. Toutefois, l'Etat bénéficiaire se réserve le droit de modifier la liste des pièces de rechange dans le cadre du pourcentage indiqué ci-dessus; ces modifications seront indiquées dans la lettre du marché.

3.6.- S'il n'est pas stipulé autrement à l'article III.6 de la partie A, les pièces de rechange sont à livrer en même temps que la fourniture proprement dite.

4. - FRACTIONNEMENT

4.1.- Si la fourniture faisant l'objet de l'appel d'offres n'est pas fractionnée en lots, la ou les quantités demandées sont indivisibles. Le soumissionnaire doit donc offrir l'ensemble de la ou des quantités indiquées.

4.2.- Si les fournitures sont fractionnées en lots, les quantités indiquées aux différents lots sont indivisibles. Le soumissionnaire doit donc obligatoirement offrir l'ensemble de la ou des quantités indiquées à chaque lot.

4.3.- Des offres partielles ne seront pas prises en considération.

4.4.- Si les fournitures sont fractionnées en lots, les soumissionnaires ont la possibilité d'offrir pour chacun des lots, pour plusieurs lots, ou pour l'ensemble des lots.

5. - VARIATIONS DE QUANTITES

5.1.- Si l'Etat bénéficiaire se réserve le droit de modifier, au moment de la commande, les quantités prévues, les limites des variations sont indiquées à l'article V.1 de la partie A.

5.2.- Dans ce cas, les prix unitaires de l'offre sont applicables aux quantités commandées dans les limites de ces variations.

6. - EMBALLAGE - MARQUAGE

6.1.- Les fournitures doivent être pourvues d'un emballage les mettant à l'abri de toute avarie pendant le transport (maritime, aérien, route et pistes).

6.2.- L'emballage des fournitures devient la propriété de l'Etat bénéficiaire.

7. - LIEU DE DESTINATION ET DELAI DE LIVRAISON

7.1.- Le lieu de destination est indiqué à l'article VII.1 de la partie A.

7.2.- Le délai de livraison est fixé à l'article VII.2 de la partie A. Il commence à courir à partir du jour de réception de la lettre de marché. Cette date sera réputée être :

- Le surlendemain de la date d'expédition (timbre de la poste) si le fournisseur a son siège dans l'Etat bénéficiaire ;

- Sept jours calendrier après le jour d'expédition (timbre de la poste) si le fournisseur a son siège hors de l'Etat bénéficiaire.

7.3.- S'il est prévu un délai de livraison propre à chaque lot, les délais ne s'additionnent pas en cas d'attribution de plus d'un lot à un même fournisseur. Dans ce cas, le délai de livraison de chaque lot court séparément.

8. - PENALITE DE RETARD

8.1.- En cas de retard supérieur à une semaine, le fournisseur est passible d'une amende calculée, par jour effectif de retard, à compter de l'échéance du délai contractuel et fixée à 1/1000e de la valeur des fournitures non livrées.

8.2.- Toutefois, si la partie manquante empêche l'utilisation normale de la totalité de la fourniture, la pénalité sera calculée sur le montant (valeur totale) de cette fourniture.

8.3.- Les pénalités seront retenues sur les sommes dues au titre du marché.

9. - RECEPTIONS

9.1.- Si l'organisme chargé de réceptionner provisoirement et définitivement les fournitures n'est pas précisé à l'article IX.1 de la partie A, il sera indiqué au plus tard dans la lettre de marché. La commission des Communautés Européennes peut être représentée aux opérations de réception.

9.2.- La réception provisoire interviendra le plus vite possible et dans un délai maximum de deux semaines à partir de la présentation des fournitures au lieu de destination. Le fournisseur doit en avertir l'organisme chargé de réceptionner.

9.3.- La réception définitive sera prononcée à l'expiration du délai de garantie. (cf. article 10.1 ci-après).

9.4.- Chaque réception, provisoire ou définitive, fera l'objet d'un procès-verbal donnant droit au paiement correspondant.

9.5.- Si les fournitures à livrer ne comportent pas un délai de garantie, la réception provisoire vaut également réception définitive.

10. - GARANTIE - SERVICE APRES VENTE

10.1.- Le fournisseur doit assurer les garanties commerciales habituelles pendant un délai minimum dont la durée est fixée à l'article X.1 de la partie A. Ce délai prendra cours à partir de la réception au lieu de destination.

10.2.- Sauf indication contraire à l'article X.2. de la partie A, le fournisseur doit disposer ou s'engager à assurer ou à faire assurer dans le pays destinataire des fournitures, un service après vente garantissant l'entretien et la réparation de ces fournitures ainsi que le réapprovisionnement rapide en pièces de rechange.

10.3.- Le soumissionnaire indiquera en annexe à son offre comment il compte s'acquitter de la présente obligation.

11. - CALCUL DES PRIX

11.1.- Suivant que les fournitures proposées sont de fabrication locale ou sont à importer dans l'Etat bénéficiaire, le soumissionnaire devra calculer les prix unitaires (et les prix globaux) de son offre sur l'une des deux bases suivantes :

11.1.1.- Pour les fournitures fabriquées dans l'Etat bénéficiaire, les prix unitaires et globaux de l'offre sont à calculer sur la base de la livraison au lieu et dans les conditions indiqués à l'article XI.1.1. de la partie A, à l'exclusion de la fiscalité interne frappant la fabrication des fournitures.

11.1.2.- Pour les fournitures à importer dans l'Etat bénéficiaire, les prix unitaires et globaux doivent être calculés sur la base de la livraison au lieu et dans les conditions indiqués à l'article XI.1.2. de la partie A, à l'exclusion de tous droits et taxes frappant l'importation des fournitures.

11.2.- Les prix unitaires et globaux calculés conformément à l'une ou l'autre des dispositions ci-dessus sont fermes et non révisables.

11.3.- Pour permettre l'établissement des offres d'une façon précise, le calcul des prix unitaires doit s'effectuer sur la base d'un lieu facilement accessible aux divers moyens de transport. De ce fait, le lieu de destination et le lieu pour le calcul du prix de l'offre peuvent être différent.

11.4.- Si effectivement l'endroit ou la condition de livraison, indiqués à l'article XI.1.1. ou XI.1.2. de la partie A pour la comparaison des offres ne coïncident pas avec le lieu de destination indiqué à l'article VII.1. de la partie A, le transport des fournitures jusqu'au lieu de destination est à la charge et sous la responsabilité du fournisseur. Les frais de transport ainsi que tous frais afférents au transport (y compris assurance, transit, etc...) sont à régler par le fournisseur. Ces frais lui sont remboursés sur pièces justificatives après réception des fournitures au lieu de destination. Ils ne doivent donc pas être compris dans les prix visés aux paragraphes 11.1.1. et 11.1.2. ci-avant.

12. - FISCALITE

12.1.- Si l'offre retenue comporte des fournitures de fabrication locale (cf. art. 11.1.1.), il sera ajouté, au prix offert, dans la lettre de marché, le montant de la fiscalité interne frappant la fabrication de la fourniture.

12.2.- Si l'offre retenue comporte des fournitures à importer (cf. art. 11.1.2.) celles-ci bénéficient de l'exonération des droits et taxes à l'importation.

12.3.- Quelle que soit l'origine des fournitures, le marché est exonéré des droits de timbre et d'enregistrement.

13. - PRESENTATION DES OFFRES

13.1.- Les offres doivent être établies sur papier libre (papier non timbré) dans la langue indiquée à l'article XIII.1 de la partie A.

13.2.- Elles doivent être envoyées par lettre recommandée dans une enveloppe cachetée à l'adresse indiquée à l'article XIII.2 de la partie A.

13.3.- En outre, l'enveloppe doit porter en rouge, dans le coin supérieur gauche la mention du numéro d'appel d'offres tel qu'indiqué à l'article XIII.3. de la partie A.

13.4.- Les offres devront parvenir à l'adresse indiquée sous l'article XIII.2. de la partie A au plus tard à la date et à l'heure indiquée à l'article XIII.4. de la partie A.

14. - CONTENU DE L'OFFRE

14.1.- L'enveloppe extérieure mentionnée à l'article 13.2. doit contenir dans une enveloppe intérieure les pièces suivantes, en double exemplaire :

14.2.- L'offre de prix proprement dite.

Cette offre de prix - prix unitaires et prix globaux - portera sur la fourniture correspondant aux spécifications ci-dessus et sera strictement conforme aux conditions indiquées aux parties A et B de l'appel d'offres. Elle tiendra notamment compte des dispositions relatives au calcul des prix (cf. article XI et 11 respectivement des parties A et B de l'appel d'offres).

14.3.- Un document selon la loi nationale en la matière, établissant que le soumissionnaire est ressortissant d'un des Etats membre de la C.E.E. ou de l'Etat bénéficiaire.

14.4.- Une déclaration du soumissionnaire certifiant que les fournitures proposées sont originaires de la C.E.E. ou de l'Etat bénéficiaire. Le pays d'origine doit être précisé.

14.5.- Si l'obligation en est prévue à l'article III.4 de la partie A, la liste des pièces de rechange avec prix unitaires.

14.6.- Sauf indication contraire à l'article X.2 de la partie A, l'indication des moyens que le soumissionnaire compte employer pour s'acquitter de l'obligation du service après-vente.

14.7.- Eventuellement, la description détaillée des fournitures offertes, c'est-à-dire tous les renseignements permettant de juger la fourniture proposées, par exemple : résistance aux conditions climatiques et routières, fonctionnement, capacités, coût de l'entretien, consommation, carburant, longévité etc..., ainsi que tout autre renseignement éventuellement demandé à l'article XIV.7 de la partie A.

14.8.- Eventuellement, les garanties supplémentaires offertes : durée, étendue,

14.9.- L'intitulé et le numéro du compte bancaire ou postal à l'adresse duquel les paiements devront être effectués

15. - MONNAIE DE L'OFFRE ET DU PAIEMENT

15.1.- L'offre de prix pour les fournitures peut être libellée et les paiements effectués directement dans la monnaie du pays du siège social du fournisseur ou du pays dont celui-ci est ressortissant, ou du pays d'origine des fournitures.

15.2.- L'offre de prix peut aussi être libellée dans la monnaie du pays qui lance l'appel d'offres ou en unités de compte européennes (U.C.E.)

15.3.- Lorsque l'offre est exprimée en U.C.E., il y aura lieu d'indiquer en même temps la monnaie dans laquelle le paiement doit être effectué. Cette monnaie est normalement celle d'un Etat membre de la C.E.E. ou celle de l'Etat bénéficiaire. La contrevaleur de l'U.C.E. retenue pour le paiement est celle du jour précédent celui-ci.

15.4.- Lorsque le paiement est effectué dans une monnaie autre que la monnaie de l'Etat bénéficiaire ou autre que la monnaie du pays du siège social du fournisseur, il est obligatoirement domicilié auprès d'une banque ou d'un intermédiaire agréé, installé dans le pays du siège social du fournisseur.

16. - DUREE DE VALIDITE DES OFFRES

Le soumissionnaire reste engagé par son offre pour une période de 60 jours à compter de la date limite pour la remise des offres.

17. - OUVERTURE DES OFFRES

Les offres seront ouvertes en séance publique à la date indiquée à l'article XVII de la partie A par la commission de dépouillement des offres.

18. - COMPARAISON DES OFFRES

Pour permettre la comparaison des offres, la conversion en monnaie de l'Etat bénéficiaire sera effectuée par les soins de la commission de dépuillement des offres sur la base des taux de parité relatifs à la valeur de l'unité de compte européenne (U.C.E.). Lors de la comparaison des offres, les taux appliqués sont ceux en vigueur le premier jour ouvrable du mois qui précède celui au cours duquel est fixée la date limite pour la remise des offres.

Les taux applicables sont publiés mensuellement au Journal Officiel des Communautés Européennes (édition suivant le 10 de chaque mois, série S).

19. - COMMANDES

Les commandes seront passées par lettre de marché sur la base de l'offre retenue et des conditions de l'appel d'offres et elles seront exprimées dans la même monnaie que la soumission.

20. - ECHELONNEMENT DES PAIEMENTS

Les paiements seront échelonnés comme suit :

20.1.- 30 % du montant du marché, au moment de la commande, contre constitution d'une caution solidaire garantissant le remboursement à 100 % du montant de ce paiement ; cette caution sera libérée de plein-droit dès réception provisoire, sur présentation de tout document probant à cet égard.

20.2.- 30 % du montant du marché sur production de la justification de l'expédition des fournitures et contre constitution d'une caution solidaire garantissant le remboursement à 100 % du montant de ce deuxième paiement : cette caution sera également libérée de plein-droit dès réception provisoire, sur présentation de tout document probant à cet égard.

20.3. - 30 % du montant du marché après réception provisoire des fournitures constatée par procès-verbal, au lieu indiqué pour la livraison (cf. article VII. de la partie A).

20.4.- 10 % du montant du marché pour solde à l'échéance du délai de garantie et après réception définitive constatée par procès-verbal.

Cette retenue de garantie peut être remplacée par la constitution d'une caution solidaire garantissant le remboursement à 100 % de son montant.

Cette caution sera libérée de plein-droit dès réception définitive sur présentation de tout document probant à cet égard ou, à défaut d'une telle réception, deux mois après l'expiration du délai de garantie, sauf réclamation exprimée par l'Etat bénéficiaire.

20.5.- Dans les cas de livraisons partielles, les paiements de 30 % dus respectivement :

- sur justification de l'expédition des fournitures (cf. 20.2)
- après réception provisoire des fournitures (cf. 20.3)

ne sont pas calculés sur le montant total du marché mais sur la valeur des fournitures réellement expédiées et réceptionnées.

20.6.- Pour les fournitures de fabrication locale (cf. article 11.1.1. ci-avant), les paiements indiqués sous 20.2. et 20.3. sont cumulés : le paiement unique de ces deux tranches est dû après réception provisoire constatée par procès-verbal.

20.7.- Pour les fournitures ne comportant pas un délai de garantie (cf. article 10.1), les paiements indiqués sous 20.3. et 20.4. sont cumulés ; le paiement unique de ces deux tranches est dû après la réception provisoire constatée par procès-verbal, laquelle vaut réception définitive.

21. - CAUTION

La caution solidaire réclamée en garantie de certains paiements sera le cas échéant établie conformément au modèle annexé à la présente partie B. Elle sera établie en faveur de l'autorité (co-contractant du marché) indiquée à l'article XXI de la partie A. Elle pourra être valablement fournie par tout institut installé dans l'Etat bénéficiaire ou dans un Etat membre de la C.E.E. et habilité, par les autorités sous le contrôle desquelles il exerce ses activités, à délivrer de telles garanties.

22. - MODALITES DES PAIEMENTS

22.1.- Pour les paiements dans la monnaie de l'Etat bénéficiaire, les quatre tranches de paiement sont ordonnancées et acquittées par l'autorité ou les autorités indiquées à l'article XXII.1 de la partie A.

22.2.- Pour les offres libellées dans la monnaie d'un Etat membre de la C.E.E., le premier et le deuxième paiements sont ordonnancés et effectués par la Commission des Communautés Européennes, Direction Générale du Développement, dont l'adresse est indiquée à l'article 25 ci-après.

Le paiement du solde sera ordonnancé par l'autorité indiquée à l'article XXII.1 de la partie A et effectué par la Commission des Communautés Européennes, Direction Générale du Développement, visée ci-dessus.

22.3.- En vue d'obtenir les paiements, le fournisseur ou son représentant doit introduire auprès de l'autorité qui ordonnance les paiements visée sous 22.1 ou 22.2 ci-avant les documents suivants :

22.3.1.- Pour le premier paiement de 30 %, en plus des factures (en 5 exemplaires) deux photocopies de la lettre de marché ainsi que la caution en original et photocopie.

22.3.2.- Pour le deuxième paiement de 30 %, en plus des factures (en 5 exemplaires), deux photocopies du document justifiant l'expédition des fournitures ainsi que la caution en original et photocopie.

22.3.3.- Pour le troisième paiement de 30 %, les factures en 5 exemplaires.

22.3.4.- Pour le solde de 10 %, les factures (en 5 exemplaires) et, le cas échéant, la caution en original et photocopie.

22.4.- Dans tous les cas où les factures sont introduites auprès des autorités de l'Etat bénéficiaire, le fournisseur est tenu d'en informer, par envoi d'une copie et de la correspondance, les services de la Commission des Communautés Européennes. Leur adresse est indiquée à l'article XXII.4 de la partie A.

23.- REGLEMENTATION

Pour tout ce qui n'est pas stipulé aux dispositions de l'appel d'offres, parties A et B, l'exécution du marché est régie par la réglementation indiquée, le cas échéant, à l'article XXIII de la partie A.

24. - ARBITRAGE

En cas de litige lors de l'exécution du marché, tous différents seront tranchés définitivement suivant le règlement de conciliation et d'arbitrage de la Chambre de Commerce Internationale.

25.- ACQUISITION DU DOSSIER D'APPEL D'OFFRES

Le texte de l'appel d'offres, disponible uniquement dans la langue du pays qui lance l'appel d'offres, peut être obtenu auprès de :

- L'adresse ou des adresses indiquées à l'article XXV de la partie A.

- Commission des Communautés Européennes, Direction Générale du Développement, 200, rue de la Loi, 1049 BRUXELLES. (BELGIQUE)

- Services d'information des Communautés Européennes :

  * D - 5300 Bonn, Zitelmannstrasse 22
  * NL - La Haye, Lange Voorhout 29
  * L - Luxembourg, Chambre de Commerce - 7, Rue Alcide de Gasperie, B.P. : 1503
  * F - 75782 Paris Cedex 16, 61 Rue des Belles Feuilles
  * I - 00187 - Rome, Via Poli, 29
  * DK - 1004 Copenhague K, Gammel Torv 4, Postbox 144
  * UK - Londres W8 4 QQ, Kensington Palace Gardens
  * IRL - Dublin, 29 Merrion Square
  * GR - Athènes, 2 Vassilissis Sofias
  * E - Calle de Serrano, 41, 5ª planta MADRID 1
  * P - Centro Europeu Jean Monnet, Rua do Salitre 56 LISBOA 1200

MODELE DE LA CAUTION (Art. 21) à établir dans la langue du pays qui lance l'appel d'offres.

Le soussigné (nom et adresse de la caution) .....
agissant par (nom de la ou des personnes représentant la caution) .....
.....
déclare se porter caution solidaire en faveur de (nom et adresse du titulaire du marché) .....
envers (nom et adresse du co-contractant du marché) .....
.....
pour un montant de ..... (montant à exprimer dans la même monnaie que celle prévue pour le paiement du marché)
représentant :

- Le pourcentage du montant du marché payable à la passation du marché
- Le pourcentage du montant payable sur justification de l'expédition
- La retenue de garantie.

(Biffer les cas pour lesquels la caution ne s'engage pas).

Nous avons pris acte des dispositions du marché relatives à la libération de la caution après réception :

- provisoire des fournitures en ce qui concerne la caution des paiements mentionnée aux premier et deuxième tirets ci-dessus,
- définitive des fournitures en ce qui concerna la caution remplaçant la retenue de garantie mentionnée au troisième tiret ci-dessus.

(Biffer les mentions inutiles).

---o0o---

ROYAUME DU MAROC

Ministère de l'Agriculture
et de la Réforme Agraire

SOCIETE BIOPHARMA

A P P E L D' O F F R E S

POUR LA FOURNITURE ET L'INSTALLATION DES EQUIPEMENTS
ET MATERIELS D'UN LABORATOIRE DE PRODUCTION ET DE
CONTROLE DE VACCINS VETERINAIRES

****

UNITE DE PRODUCTION DE VACCIN CONTRE LA RAGE

ANNEXE TECHNIQUE

Description des équipements et matériel

ROYAUME DU MAROC

Ministère de l'Agriculture
et de la Réforme Agraire

SOCIETE BIOPHARMA

PRELIMINAIRE

Pour chacun des lots, l'offre devra comprendre la fourniture de toutes les notices techniques et d'entretien nécessaire.

Il est demandé en plus aux soumissionnaires de présenter une offre pour un contrat d'entretien annuel, pour les appareils mentionnés en tête des lots, et pour tous les appareils pour lesquels il jugera que c'est souhaitable.-

LOT N° 1

AUTOCLAVES ET FOUR PASTEUR

L'offre devra comprendre la formation du personnel d'exploitation et d'entretien et les pièces détachées nécessaires pour 2 ans de fonctionnement.

Délai de livraison : 4 mois.

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
1	1	Autoclave horizontal	Installation : Entre pièces 5 et 10 Autoclave de frontière à double entrée Chambre de stérilisation = accès à double entrée. Raccordement étanche, dimensions intérieures = 500x500x1000mm timbre = 2,5 bars - corps et portes en acier inoxydable norme AST 316 L poli et passivé. Fermeture par portes coulissantes verticales. Sécurité de fermeture = voyant lumineux contrôlant la fermeture correcte de la porte et de la porte opposée. Impossibilité de mettre en service si la fermeture est incorrecte. Condamnation de l'ouverture si l'autoclave est sous pression ou si le programme n'est pas terminé. Sécurité générale = accessoires réglementaires = soupape, manomètre, circuit électrique de contrôle en 24 V avec transformateur de sécurité - Calorifuge et enveloppe métallique - Enveloppe amovible pour opérations de contrôle (mines) Admission de vapeur comprise entre 3,5 et 6 bars, vapeur saturée et propre fournie par l'établissement - Déflecteur de vapeur couvrant toute la virole de l'autoclave pour protéger les objets à stériliser de la condensation. Contrôle de la stérilisation par régulateur électroniqu à affichage numérique, filtre sur la rentrée d'air stérilisé à chaque opération (0,22 μ).

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
			Purgeur automatique éliminant les condensations au cours des stérilisations. Bac condenseur avec barboteur pour la protection des canalisations d'écoulement Pompe à vide : modèle à anneau liquide avec alimentation en liquide automatique - moteur électrique triphasé protégé par discontacteur ; débit 20 à 40 m3/heure. Commandes : automatique pour 3 programmes : stérilisation liquides. Stérilisation des solides. Stérilisation des membranes filtrantes. Enregistrement des températures et pression. Chaque cycle sur bande à plusieurs voies (3) Appareillage : la minuterie de stérilisation ne doit tenir compte que du temps réel de stérilisation. Tableau lumineux signalant les programmes et les phases du cycle automatique . Sectionneur de protection sur l'arrivée du courant. Commande manuelle de secours. Présentation : Autoclave monté en frontière façade en acier inoxydable et raccordement étanche sur cloison. Accessoires : 4 chariots et 4 paniers transbordeurs en inox : proposer plusieurs options.
2	1	FOUR PASTEUR	Four à chaleur sèche. Dimensions internes minimales : 100x60x120 cm (Hauteur 120). Gamme de température 50 à 250°C. Précision + ou - 2°C. Thermostat protégé des surcharges. Thermomètre à cadran avec indication effective de la température (en façade). Evacuation de l'air par vannes à la partie supérieure. Minuterie électrique démarrant à la température programmée et coupant le chauffage en fin de cycle. Durée du cycle jusqu'à 12 Heures.

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
			Circulation d'air - 7 étagères à trous en inox réglables en hauteur. Intérieur et extérieur en tole inox polie et passivée. Voltage 380/220 V. Puissance 6000 W environ Lampes témoin. Installation pièce 5. Enregistrement de la température pour chaque cycle.

LOT. N°2

APPAREIL DE PRODUCTION ET DE CONSERVATION DU FROID

Refrigérateurs - Congélateurs - Conteneurs - Machine à glace...

L'offre devra comprendre la formation du personnel d'exploitation et d'entretien et les pièces détachées nécessaires pour 2 ans de fonctionnement.

Délai de livraison : 4 mois.

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
1	1	Congelateur à - 18 C	Installation : pièce n°9 Volume interne 300 litres. Porte verticale 5 tiroirs. Fermeture de la porte à clef. Température réglable par thermostat jusqu'à -30°C ± 1°C limite -18°C. Lecture de la température sur thermomètre en façade. Lampes témoins. Alarme lumineuse et sonore. Voltage 220 V - Puissance 1000 W environ.
2	2	Congelateur à - 80°C	Installation : pièces n°6 et n°16 Congelateur vertical - Capacité 500 litres environ équipé de 5 compartiments avec portillons garde-froid et étagères refrigérées. Cuve intérieure en acier inoxydable. Fermeture à clef. Régulateur électronique de température avec affichage numérique. Température de travail -85°C ± 1°C. Système d'alarme sonore et visuel active en cas de remontée de t° ou de coupure de courant. Alimentation de l'alarme par batterie et chargeur. Prise pour raccordement à une alarme à distance. Fonctionnement assuré par 2 compresseurs hermétiques suffisamment puissants et montés en cascade. Alimentation 220 V - Puissance = 3000 W environ

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
3	1	Machine à congeler les serums et les cellules	Installation = Pièce n°9 Appareil composé de : . Une source de froid . Un thermoregulateur . Un programmateur . Un dispositif relais entre thermoregulateur et refroidisseur. Le refroidisseur comprend un groupe compresseur classique et un échangeur permettant de refroidir un liquide jusqu'à une température de -35°C Le thermoregulateur comprend : une pompe de circulation, une source de chaleur qui permet éventuellement de compenser l'excès de refroidissement, un dispositif de mesure de la température par sonde de platine. Un système de régulation électronique avec affichage de la température réelle du bain. Le programmateur permet de stocker en mémoire plusieurs programmes composés chacun de différents points de consigne. Il reçoit la mesure de la température réelle du bain et il commande le thermorégulateur. - Domaine d'emploi = - 40°à + 200°C - Vitesse de refroidissement = 1 degré par minute - La cuve sera en inox.
4	1	Congelateur à - 85°	Congélateur à très basse température pouvant supporter des températures ambiantes + 30° et suffisamment isolé puis avec frigorifique suffisante pour congeler 10 litres de liquide aqueux en - de 2 heures. Régulation de t° très précise dans une gamme - 20° - 90°C Système d'alarme sonore et lumineuse alimenté par batterie rechargeable.

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
			Système double porte interne et externe a limentation 220 V / 50 Hz Livré avec enregistreur de t° et dispositif de sécurité par injection de CO2 en cas de réchauffement anormal - capacité 300 litres Accessoires livrés avec appareil 12 RACKS de stockage se composant d'un ensemble de tiroires alvéolés de la taille des compartiments.

LOT. N°3

APPAREILLAGE DE LABORATOIRE DIVERS
PETIT MATERIEL

L'offre devra comprendre la formation du personnel d'exploitation et d'entretien et les pièces détachées nécessaires pour 2 ans de fonctionnement.

Délai de livraison : 4 mois

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
1	1	PH mètre	Installation : pièces 5 et 6 PH mètre à affichage digital gamme de mesure 0-14 pH sensibilité 0,01 pH 0 - ± 2000 mV sensibilité 1 mV Correction de température 0-100°C Compensation de pente 90 à 100 % Dérive à long terme = inf. à 0,02 pH/jour Affichage de la polarité. Voltage 220 V puissance 10 VA 1 Electrode combinée en verre avec support. 2 électrodes de rechange.
2	1	Balance	Installation = pièce 16 Balance monoplateau, dimension minimale du plateau 50 x 50 cm, Capacité 100 Kg. Lecture sur cadran ou affichage numérique sensibilité 50 g Plateau résistant à la corrosion Possibilité de branchement pour calculateur périphéphérique. Tare automatique.
3	1	Agitateur magnétique	Installation = pièce 8 Agitateur magnétique chauffant. Plateau de 20 x 20 cm minimum. Rotation de 1 à 1000 t/mn pour récipients de 100 ml à 2 litres. Voltage 220 V Fournir : 5 barreaux aimantés recouverts de teflon de 3 tailles différentes.
			.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
4	1	Agitateur magnétique	Installation = pièce 16 Agitateur magnétique Plateau de 50 x 50 cm minimum Rotation de 1 à 1000 t/mn pour récipients de 5 à 50 litres. 220 V. Fournir 5 barreaux aimantés recouverts de téflon de 2 tailles différentes
5	3	Unité pour flacons roulants	Installation = pièces 21 et 7 Agitateur roller pour flacons et bouteilles = agitateur modulaire pour cultures en grande série sur flacons roulants. Ensemble composé de : 1 élément de base à 6 rouleaux équipé d'un moteur silencieux à faible échauffement pouvant recevoir 8 plateaux à 6 rouleaux animés par l'élément de base. L'ensemble doit être mobile et en matériau résistant à la corrosion. Vitesse de rotation réglable en continu de 0,1 à 3 t/mn par controleur électronique avec affichage sur tachymètre. Doit pouvoir fonctionner en étuve à 37°C. Les dimensions ne doivent pas excéder les valeurs suivantes : hauteur = 180 cm largeur = 75 cm longueur = 75 cm Chaque unité devra être livrée avec 5 jeux de 90 flacons en polystirène cristal stériles surface utile 850 cm2 bouchage aérobie - anaérobie adaptable au système proposé.
6	1	Pompe avec variateur de vitesse	Installation = pièce 16 Pompe péristaltique avec moteur électrique muni d'un variateur de vitesse électronique et inversion du sens de rotation. Système avec réducteur permettant d'utiliser des tuyaux souples de différents diamètres avec débit possible de 1 m³ heure.

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
7	1	Microscope inverse	Installation = pièce 9 Microscope binoculaire inversé pour examen de cultures cellulaires comprenant : - un statif de microscope de type inversé à mise au point rapide et fine par boutons coaxiaux - butée pour la localisation immédiate. Revolver monté à demeure pour 5 objectifs , Platine sans chariot de grande taille permettant l'observation de boites d'épaisseur 12 cm. Condenseur permettant l'observation en contraste de phase. Tube binoculaire à visée inclinée 30° oculaires X 10/18 plans à grands champs 1 objectif plan 2,5/0,08 distance frontale 11,8 mm 1 objectif achromatique à champ plan 4 x/0,12 1 objectif à contraste de phase 10 x/0,25 1 objectif à contraste de phase 20 x/0,32 1 objectif à contraste de phase 32 x/0,40 Anneau de lumière lunette de mise au point coulisseau pour anneaux de lumière Boitier de lampe complet avec transformateur : alimentation pour lampes aux halogènes de 12 V/100 W. Verre diffusant, cable de connexion avec prise européenne. Housse de protection.
8	1	Microscope	Microscope binoculaire comprenant : 1 statif avec mise au point lente et rapide. Support de condenseur réglable. Révolver porte objectif pour 4 objectifs minimum. Platine à chariot croisé simple tube binoculaire oblique. 2 oculaires 10 x/18 Objectifs : x 10/-0,22 x 40/ 0,65 x 100/125 à immersion x 100/ à contraste de phase .../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
8	1	Microscope (suite)	Dispositif de contraste de phase avec centrage et condenseur adéquat . Eclairage par lampe incorporée avec variateur d'intensité lumineuse. Alimentation 220 V - Housse de protection. 4 lampes de rechange Installation = pièce 9
9	1	Photomètre à LED pour analyse rapide des eaux	Lecture en transmission ou en concentration . Sans filtres Spectre en raie sans interférence de couleur. Couverture total du spectre. 400 à 700 nm Alimentation par piles 1,5 V et commutation automatique sur secteur 220 V Avec coffret de transport et coffret de réactifs. Réactifs pour dosage de : Chlore total Chlorures Hydrazine { taux élevés Phosphates { taux faibles pH
10	1	Centrale de mesure de température	Permettant d'imprimer des mesures de températures provenant de thermocouples sur une imprimante 16 colonnes avec impression du JOUR - HEURE - TEMPERATURE. Mémoire interne sur 24 heures avec batterie rechargeable de sauvegarde en cas de panne secteur. Consigne haute et basse programmable Alarme sonore en cas de dépassement Impression de l'heure de dépassement Couplée à un multiplexeur de 40 entrées. La centrale sera livrée avec : 15 sondes de température à immersion, Thermocouples K, équipées de connecteurs miniatures Mâles. 15 sondes pour air et gaz, Thermocouple K, équipées de connecteurs miniatures mâles 10 sondes de surface, Thermocouple K, équipées de connecteurs miniatures mâles.

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
10 (suite)			40 Prises miniatures femelles pour thermocouples K 48 Pinces de fixation des prises miniatures sur les cables 300 Mètres cable thermocouple K, 9/10, isolé PVC
11	1		TROUSSE DE MAINTENANCE PORTABLE, COMPOSITION ELECTRO-MECANIQUE Composition métrique de 86 outils
12	1	Balance ROBERVAL	Portée 5 Kg plateaux de diamètre 200 mm Livré avec ensemble de poids sur socle : Total de la série 2000 g.
13	1	Balance électronique	Balance électronique monoplateau de précision - 0,1 g et pesée de 0 à 6000 g Affichage digital 220 V/50 Hz
14	1	Pompe à vide	Compresseur à membrane pour faire vide - limite 2 mbar - pression relative 7 bar - 100% sans huile. 220 V/50 Hz
15	1	Bain marie	Cuve intérieure et extérieure et couvercle en acier inox. Couvercle plat en acier inox avec anneaux concentriques. Un thermomètre de contrôle - robinet de vidange - volume 48 litres environ pour dimensions 600 x 200 mm - 220 V/50 Hz
16	1	Résitance thermostatée	Résistance plongée dans liquide à réchauffer avec affichage numérique de la température - consigne - 20 à + 105°C et affichage chauffage 0 à 1000 W. Pompe débit 10 1/minute. Indicateur de chauffe - indicateur de surchauffe avec alarme. Dimensions 135 x 150 x 300 mm 220 V/50 Hz
			.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
17	2	Agitateur type VORTEX	Agitateur pour tube à essai par vibration déclenché par pression ou marche continue. 220 V/50 Hz
13	1	Centrifugeuse refrigérée à controle électronique	Regulateur électronique et numérique de la vitesse et de la température Vitesse maxi = 6000 tours/m t° min = - 5° Capacité maxi = 4 x 300 ml minuterie = 0 à 60 mn frein électrique en réglage continu · Chambre interne en acier inox conforme avec normes de sécurité. Alimentation : 220 V. Fournie avec rotors correspondants(2) avec 4 portoirs et 4 réducteurs complets avec 48 tubes et 4 réducteurs complets de 2 x 50 ml
19	1	Incubateur à CO2 automatique	à 2 compartiments - volume int. : 2 x 161 litres réglables indépendamment Double isolation - Fibre de verre + jaquette d'eau construction externe et interne en inox, y compris plateau et support. équipement intérieur : 6 plateau inox/compartiment 45 x 45 cm. Centre plats. t° réglable de + 5° au dessus de l'embrenchement à + 50° - point fixe à 37° thermostat. Sécurité réglable affichage numérique Alarme sonore et visuelle de dépassement CO2 réglable de 0 à 20% en affichage numérique et alarmes Filtre antibactérien de grande surface à entrée CO2 Réservoir d'eau amovible pour nettoyage, humidité relative saturation à 98% à 37°. Porte extérieure chauffante évitant condensation sur porte vitrée. Mano détendeur CO2 double alimentation.

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
20	1	Appareil type Multiskan Titertek MC	Electrique : 220 V 150 H Multiskan titertek MC 220 V 150 + 8 filtres et roues de filtres interférentiels (standard) + accessoires.
21	1	Agitateur	Agitateur de plaques à vitesse variable 220/50 Hz
22	1	Pipette type titertek	Pipette Titertek à 8 cannaux - volume variable de 5 - 50 microlitres
23	1	Pipette type titertek	Pipette Titertek à 8 cannaux volume variable de 50 - 200 microlitres
24	1 ensemble	Petit matériel de laboratoire	Cet ensemble comprend les articles suivants aux quantités précisées : - 2 statifs à base en H en fonte émaillée lourd avec tige inox = base 550 x 350 mm tige diamètre 25 x 750 mm - 4 anneaux de support en acier inox modèle fermé diamètre 70 mm longueur de tige 125 mm diamètre de tige 8 mm - 4 noix universelles de serrage en acier inoxydable serrage perpendiculaire ou parallèle de 2 tiges jusqu'à 16 mm de diamètre - 4 pinces de support en alliage léger à 4 doigts à mors vynilisés, tige en acier inox de 160 mm et de 8 mm de diamètre. - 3 bec bunzen de sécurité, à 3 modes de fonctionnement: instantané, continu et pedale, muni de 3 sécurités (sécurité de flamme, sécurité thermique et sécurité par timer). Livré avec buses pour gaz butane et propane et écran pare-vent.

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
24		suite	- 5 Appareils à pipetter pour produits pathogènes composé de : - 1 poignée avec embout adaptable sur toutes les pipettes - 1 pompe silencieuse murale et un ensemble de tuyaux et clapets de sécurité - Filtre à air - 5 micropipettes automatiques type Eppendorf à capacité réglable, corps en polypropylène insensible à la température, éjecteur automatique de cones, affichage numérique de la capacité avec code de couleur. Capacité 10 à 100 microlitres. Livré avec 1000 cones stériles de 1 à 100 microlitres - 2 pipettes Terasaki à canaux multiples (6 canaux) de volume variable de 1 à 5 microlitres pour plaques Terasaki à 60 cupules livrées avec 500 pointes à bandes de 6. - 20 boîtes en acier inoxydable pour stériliser les pipettes avec couvercle coiffant diamètre 60 à 70 mm Longueur 400 à 500 mm. - 4 Ecrans faciaux de protection transparents 290 x 190 mm avec serre-tête frontal léger pouvant être relevé en position haute face interchangeable. - 4 paires de lunettes de protection monture légère. coques latérales plastique incolore. - 1 lave pipette automatique en polyethylène comprenant un bac de lavage, un bac de rinçage et un panier à anse. Diamètre 200 mm - Hauteur 1000 mm - 5 crayon diamant pour écrire sur le verre forme critérium à pointe amovible. - 5 paires de ciseaux en acier chromé forts droits à bout rond - Longueur 160 mm - 5 paires de ciseaux fin droits à bout pointus longueur 100 mm. .../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
24		suite	- 2 cellules de Malassez en ecrin avec 2 lamelles planes - double quadrillage. - 5 pinces brucelles en acier inox bout droit pointu longueur 105 mm - 5 pinces brucelles en acier inox bout droit rond longueur 145 mm - 4 Thermomètres industriels droits gradués sur plaque opale de diamètre 18 à 20 mm. Plongeant de diamètre 6 à 10 mm. Température de 0° à + 150 graduation en degré. - 5 boites rectangulaires en acier inox pour stériliser les instruments de laboratoire Longueur 270 mm Largeur 150 mm Hauteur 60 mm - 2 Entonnoirs coniques en inox sans anse Diamètre 200 mm - Capacité 1500 ml. - 12 lampes germicides génératrices de rayons U.V comprenant chacune une réglette complète avec transformateur, douilles, starter et deux tubes U.V - 2 ensembles complets en acier inox pour la collecte, le transport, le stockage, la stérilisation à 3 étages sur lequels viennent s'ajuster 3 paniers inox de dimensions : longueur 575 mm, largeur 380 mm hauteur 130 mm. - 4 paniers de stérilisation de forme conique en fil d'acier inox. 2 poignées rabattables maille de 11 x 11 mm. Dimensions 575 x 250 mm Hauteur 130 mm.

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
24 uite	1		Assortiment de raccords miniatures en polypropylène comprenant : raccords droits et en "T", réducteurs et coudes dans les tailles 1,6 x 1,6 2,3 x 2,3 3,1 x 3,1
	1		Assortiment de raccords cannelés tube à tube en polypropylene Comprenant : Raccords droits, "Y", "T", croix, coudes, réducteurs dans les dimensions métriques, fractionnées et miniatures.
	1		Assortiment de raccords cannelés NPT en polyethylene comprenant : 24- Raccords droits mâles de 1/8" diamètre tube 4,7 mm 24- " " " de 1/8" " " 6,3 mm 24- " " " de 1/4" " " 4,7 mm 24- " " " de 1/4" " " 6,3 mm 24- Raccords coudés mâles de 1/8" diamètre tube 4,7 mm 24- " " " de 1/8" " " 6,3 mm 24- " " " de 1/4" " " 4,7 mm 24- " " " de 1/4" " " 6,3 mm
	6		Multi connecteurs AFNOR à 6 prises Protection par disjoncteur unipolaire et interrupteur lumineux.
	2		Mini thermomètres à thermocouple - 40 x 1000°C Résolution 0,1°C - Pile 9 V Equipé de : 1 sonde thermocouple Nicr-Ni à usage général Longueur 220 mm Ø 0,5 mm. 1 sonde pour mesure de surface longueur 220 mm Ø 1,5 mm 1 sonde mesure dans l'air longueur 100 mm Ø 3 mm

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
24 suite	4		Electrovannes à pincement Bobine 24 V - 2 voies - NF (normalement fermée) pour tube de 6,4 x 9,5 .
	5		-Bec pour butane vissé sur cartouche camping gaz international.
	10		-Pince hermostatique de KOCHER a griffes, droite longueur 160 mm
	20		-Pince de serrage pour tube caoutchouc, en acier nikelé ouvrante à charnière. Ouverture intérieure 45 x 30 mm Quantité : 20
	20		Ouverture intérieure 18 x 18 mm Quantité : 20
	3		-Poubelle en tube chromé, couvercle hermétique à fermeture silencieuse pédale d'ouverture, roues caoutchoutées, capacité 30 l -
	5		-Spatule double en acier inox, l'extrémité spatulée l'autre en cuiller 1 x L 210 x 25 mm
	2		-Pince à sertir les capsules métalliques sur les tubes échantillons bague 11 mm Quantité : 2
	5		-Manche de bistouri à lames démontables en acier inox n°23
			- Barreaux aimantés pour agitateurs magnétiques forme droite revêtus PTFE température d'emploi jusqu'à 200°C.
	20		dim. 25 x 6 —— 20
	20		45 x 9 —— 20
	20		60 x 11 —— 20

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
24 suite	20		- Supports de tube à essais en fil de fer INOX alvéoles de 22 mm nombre de trous 24
	20		- Poires propipettes à trois soupapes à bille Modèle standard.
			- Pipettes compte gouttes
			- Bechers en acier inoxydables Bord verseur 10 x 2000 ml
	5		- Bec Meker droits à robinet au butane propane dimension 185 x 30 mm
	5		- Cadres à quatre pieds en acier inoxydable dimensions 155 x 155 h : 220 mm
	10		- Boites pour préparations microscopiques (lames standard) 76 x 26 mm - Boites 100 lames
			- Bouchons en silicone Rhodorsil

Hauteur	Ø inf x Ø sup	Quantité
56	50 x 61	50
51	46 x 55	50
49	40 x 49	50
45	36 x 43	50
43	34 x 40	50
42	31 x 37	50
40	28 x 34	100
36	26 x 32	100
33	24 x 29	100

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
24 suite	5		- Paniers cylindriques en fil d'acier inox Ø 240 mm x h = 180
	5		- Poire soufflante à réservoir
			- Micropipettes compte-gouttes stérilisable en polypopylène translucide embout acier inox
	20		vol. délivrée 50 microlitre
	20		vol. délivrée 25 microlitre
			- Seringue automatique pour distribution de doses précises et identique. La course du piston est réglable par disque molleté pour ajuster le volume désiré Fournie complète avec tous ses accessoires
	20		Capacité 2 ml
	20		Capacité 5 ml
	20		Capacité 10 ml
	10		- Minuteur 0 à 110 mm alarme sonore de fin de course
	5		- Pendule murale à quartz - Fixation murale - indication h, mn, et s. alimentation par pile 3 V
	2		- Compteur à main Fonctionnement par action sur le poussoir, affichage 4 chiffres. Remise à zéro par bouton molleté
			- Plateaux en acier inox coins arrondis avec surface lisse. Dimensions : L x l x pro
	10		525 x 375 x 150
	10		395 x 280 x 70 en mm

LOT. N°4

EQUIPEMENT D'UNE CHAMBRE FROIDE A +2°C +4°C
ET DE 2 CHAMBRES ETUVES A 37°C

L'offre devra comprendre la formation du personnel d'exploitation et d'entretien et les pièces détachées nécessaires pour 2 ans de fonctionnement.

N°	Quantité	Description - Spécifications
		I.- EQUIPEMENT CHAMBRE FROIDE
		A.- Unité de condensation à air comprimé
1	1	- Groupe semi-hermétique de 4700 Fg/h T° Evaporation - 5°C T° condensation 46°C Fluide frigorigène, R 22 Carter équipé d'une résistance de réchauffage.
2	1	- Condenseur à air correspondant au groupe ci-dessus Puissance absorbée : 0,4 Kw
		B.- Evaporateur
3	1	- Frigorifere mural d'une puissance frigorifique de 5000 Fg/h . Débit d'air J 800 m3/h . 3 ventilateurs de puissance totale absorbée 0,51 Kw . Equipé d'un détendeur thermostatique adéquat.
		C.- Eléments du circuit
4	1	- Vanne solenoïde
5	1	- Filtre deshydrateur - Type Danfoss DM Embouts à souder de 3/8"
6	1	- Voyant d'humidité et de liquide Embouts à souder 3/8"

.../...

N°	Quantité	Description - Spécifications
7	1	- Séparateur d'huile DANFOSS OUB 1 - Ø refoulement 5/8"
8	1	- Pressostat HP Type DANFOSS KP.5/6 à 30 bars avec réarmement
9	1	- Pressostat BP Type DANFOSS KP 1/ -1,5 →7,5 Diff. 0 - 2,5
10	1	- Thermostat d'ambiance - à bulbe capillaire - Echelle -5°C à + 30°C. Différentiel réglable de 1 à 7°C
11	1	- Manomètre aspiration Type Blondelle Ø 65
12	1	- Manomètre Refoulement Type Blondelle Ø 65
13		- Vannes d'isolement Manuelles à membrane embouts à souder de :
	4	- 1/4"
	2	- 3/8"
	2	- 5/8"
14	1	- <u>Bouteille accumulatrice de liquide</u> Capacité 12 litres. Type FRIGA BCR 12 L - Pression de service = 19,8 b Pression épreuve 40b - Equipée d'un robinet d'équerre double effet sur la sortie.
15	1	- <u>Echangeur de chaleur</u> Entrée et sortie gaz embouts à souder. Ø 7/8" Entrée et sortie liquide embouts à souder Ø 3/8"

.../...

N°	Quantité	Description - Spécifications
16	1	Tuyauterie
		Tubes cuivre qualité frigorifique polis miroir, déhydratés et bouchés recuits.
	5 ml	Ø 1/4"
	10 ml	Ø 3.8"
	10 ml	Ø . 5/8"
	10 ml	Ø 7/8"
	6	- coude cuivre 3/8"
	6	- coude cuivre 5/8"
	6	- coude cuivre 7/8"
	6	- Tes cuivre de 1/4"
		C.- Equipement électrique
17	1	- COFFRET METALLIQUE EN ACIER
		tôlé électrozinguée de 15/10 - Deux couches d'impression phosphatantes, une couche d'apprêt, deux couches de peinture serrure de sûreté.
		Etanche IP 557.
		Dimensions 800 x 600 x 300 avec platine perforée.
18	1	- SECTIONNEUR PORTE-FUSIBLES TETRAPOLAIRE
		Intensité nominale = 25 A
		Fusible 10 x 38
		1 contact auxiliaire de précoupure
19	2	- SECTIONNEUR PORTE-FUSIBLES TRIPOLAIRE
		Intensité nominale : 25 A
		Fusible 10 x 38
20	2	- CONTACTEURS TRIPOLAIRES
		Courant d'emploi 9 A (AC 3)
		Fixation par encliquetage ou vis
		Bobine 24 V
		Puissance 2,2 Kw en 220 V
		4 Kw en 380 V

.../...

N°	Quantité	Description - Spécifications
21	1	- CONTACTEUR TRIPOLAIRE Courant d'emploi 12 A (AC 3) Fixation par encliquetage ou Vis Bobine 24 V Puissance 3 Kw en 220 V - 5,5 Kw en 380 V
22	1	- RELAIS THERMIQUES 1,6 à 2,5 A pour contacteurs tripolaires ci-dessus désignés
23	1	- RELAIS THERMIQUES 1 à 1,6 A - pour contacteur tripolaires ci-dessus désignés.
24	1	- TRANSFORMATEUR 380 V - 24 V de 500 VA
25	10	- COUPE CIRCUIT PLASTIQUE à préhenseur pour cartouche 8,5 x 31,5
26	6	- COUPE-CIRCUIT PLASTIQUE à préhenseur pour cartouche 10 x 38
27	3	- RELAIS AUXILIAIRE pour circuit de commande courant alternatif 50 Hz à 4 contacts instantanés "F" - Bobine 24 V
28	3	- CONTACTEUR AUXILIAIRE pour circuit de commande courant alternatif 50 Hz à 4 contacts instantanés 2 "F" 2 "O" - Bobine 24 V.
29	2	- RELAIS TEMPORISE D'AUTOMATISME DE 0,20 à 300 sec pour circuit de commande alternatif 50 Hz et continu. A émission de tension (travail) - Bobine 24 V Fournis avec ambases (du type RHT 418 B de télémécanique)

.../...

N°	Quantité	Description - Spécifications
30	2	- RELAIS D'AUTOMATISME TEMPORISE 0,20 à 300 S - pour circuit de commande alternatif (50 Hz) ou continu A manque de tension (Repos) - Bobine 24 V Fournis avec embases (Du type RHR 418 B de télémécanique)
31	6	- DISJONCTEURS MAGNETO-THERMIQUE UNIPOLAIRES 0,63 à 1 A
32	3	- BOUTONS TOURNANTS A CROSSE 3 positions dont 2 "F" Diamètre de perçage 22,2 mm à tête circulaire, collerette métallique chromée, Raccordements par vis et étriers.
33	4	- BOUTONS TOURNANTS A CROSSE 2 positions dont 1 "F" Diamètre de perçage 22,2 mm A tête circulaire, collerette métallique chromée, raccordements par vis et étriers.
34	6	- VOYANTS LUMINEUX DE SIGNALISATION Perçage Ø 22 Z - tête circulaire collerette métallique chromée Couleur verte - Lampes Ba 9s - 220 V
35	6	- VOYANTS LUMINEUX DE SIGNALISATION IDEM ci-dessus - Mais couleur rouge
36	6	- VOYANTS LUMINEUX DE SIGNALISATION Idem ci-dessus, mais couleur Jaune.

.../...

N°	Quantité	Description - Spécifications
		II - EQUIPEMENT CHAMBRES ETUVES
37	2	- Coffrets métalliques en tôle acier électrozinguée, 15/10 d'épaisseur deux couches d'impression phosphatantes, une couche d'apprêt - deux couches de peinture - Serrure de sureté Etanche IP 557 Dimensions 400 x 300 x 200 Equipés de platines perforées
38	2	- Sectionneurs TETRAPOLAIRES, porte fusible Intensité nominale 25 A Cartouche fusible 10 x 38 1 contact auxiliaire de précoupure
39	20	- Coupe circuit standard - plastique de 10 A (type Hager L 104)
40	6	- Contacteurs auxiliaires pour circuit de commande courant alternatif à 4 contacts instantanés - 3 "F" 1 "O" Bobine 220 V
41	3	- Boutons tournants à crosse 3 positions Dont 2 position "F" Diamètre perçage 22,2 mm Tête circulaire, collerette métallique chromée
42	6	- Boutons tournants à crosse 2 positions 1 "O" 1 "F" Diamètre perçage 22,2 mm Tête circulaire Collerette métallique chromée

.../...

N°	Quantité	Description - Spécifications
43	6	- Voyant lumineux de signalisation Diamètre perçage 22,2 mm Tête circulaire Collerette métallique chromée Couleur verte Lampe BA 9 S - 220 V
44	3	- Voyant lumineux de signalisation IDEM ci-dessus mais couleur Jaune
45	2	- Régulateur de température A deux points de consigne et 3 plages (1 consigne principale - 1 consigne auxiliaire) Etendue de mesure + 10 à 45°C Modulation de durée (Action proportionnelle et dérivée) Indicateur galvanométrique, ou numérique de la valeur réelle Résistance thermométrique Platine 100 Ω à 0°C Type encastrable, cadre frontal 96 x 96 mm Alimentation 220 V
46	2	- Sonde à résistance platine 100 Ω à 0° Sonde d'ambiance, boitier en fonte d'aluminium.
47	2	- Aerothermeshelicoïdes électriques Tension d'utilisation 380 V triphasé Débit 780 m3/h environ Vitesse 900 t/mn Puissance 3 Kw Thermostat de sécurité à réarmement automatique Eléments chauffants blindés à faible température de surface.

LOT. N°5

VERRERIE DE LABORATOIRE

Délai de livraison : 4 mois

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
1	10	Flacons de 5 litres	Flacons cylindriques en verre borosilicaté "Pyrex" ouverture 60 mm
2	5	Flacons de 10 litres	Flacons cylindriques en verre borosilicaté "Pyrex" ouverture 60 mm
3	10	Flacons de 20 litres	Flacons cylindriques en verre borosilicate "Pyrex" ouverture 60 mm
4	100	Flacons à milieu de 1000 ml	Flacons cylindriques en verre borosilicate gradué avec bouchon bakelite à vis et capsule autoclavable.
5	100	Flacons à milieu de 500 ml	Flacons cylindriques en verre borosilicate gradué avec bouchon bakelite à vis et capsule autoclavable.
6	200	Boite de Petri	Boite de Petri en verre borosilicate diamètre 100 mm
7	20	Fioles de Erlenmeyer 100 ml	Fiole conique de 1 litre graduée à col de diamètre 44mm
8	20	Becher de 2000 ml	Récipient cylindrique gradué en verre borosilicate à bec forme basse
9	20	Becher de 1000 ml	Récipient cylindrique gradué en verre borosilicate à bec forme basse.
10	20	Becher de 500 ml	Récipient cylindrique gradué en verre borosilicate à bec forme basse.

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
11	20	Becher de 500 ml	Récipient cylindrique gradué sur verre borosilicate à bec - forme haute.
12	100	Boîtes de Roux	Flacons plats dissymétrique pour culture en position couchée. Col incliné en verre borosilicaté - Capacité 1000 ml.
13	10	Eprouvette graduée de 2000 ml	Eprouvette cylindrique graduée en ml à bec en verre borosilicaté - Capacité 2000 ml
14	30	Eprouvette gradué de 1000 ml	Eprouvette cylindrique gradué en ml à bec - en verre borosilicaté - capacité 1000 ml
15	30	Eprouvette graduée de 500 ml	Eprouvette cylindrique graduée en ml à bec - en verre borosilicaté - capacité 500 ml
16	30	Eprouvette graduée de 100 ml	Eprouvette cylindrique graduée en ml à bec en verre borosilicaté - capacité 100 ml
17	100	Pipettes de 25 ml	Pipettes en verre borosilicaté - graduation au 1/10 ml Capacité 25 ml - code de couleur
18	200	Pipettes de 10 ml	Pipettes en verre borosilicaté. Graduation au 1/10 ml Capacité 10 ml - code de couleur
19	200	Pipettes de 5 ml	Pipettes en verre borosilicaté - graduation au 1/10 Capacité 5 ml - code de couleur
20	500	Pipettes de 2 ml	Pipettes en verre borosilicaté - graduation au 1/100 - Capacité 2 ml - code de couleur
21	500	Pipettes de 1 ml	Pipettes en verre borosilicaté - graduation au 1/100 Capacité 1 ml - code de couleur
22	20	Ballons à fond plat 2000 ml	Ballon à fond plat en verre borosilicaté col étroit - capacité 2000 ml

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
23	20	Ballon à fond plat 1000 ml	Ballon à fond plat en verre borosilicaté col étroit - capacité 1000 ml
24	20	Ballon à fond plat 250 ml	Ballon à fond plat en verre borosilicaté col étroit - capacité 250 ml
25	200	Tubes à essais	Tubes à essai en verre borosilicaté taille 18 x 180
26	200	Tubes à essais	Tubes à essai en verre borosilicaté taille 26 x 200
27	20 Kg	Canne de verre	Canne de verre pour pipettes Pasteur Diamètre 8 mm.
28	1000	Lames porte objet	Lames en verre à bord brut épaisseur 0,8 à 1 mm prélavées
29	1000	Lamelles	Verre ordinaire taille 22 x 22 mm
30	10	Fiole jaugée 100 ml	Fiole à col étroit à un trait jaugée à 100 ml en verre borosilicaté.
31	10	Fiolde jaugée 1000 ml	Fiole à col étroit à un trait jaugée à 1000 ml en verre borosilicaté.
32	10	Cristallisoir	Cristallisoir verre borosilicaté avec bec verseur capacité 1500 ml
33	10	Cristallisoir	idem Capacité 3000 ml
34	100	Flacons de 250 ml	Flacons cylindriques en verre borosilicaté gradués avec bouchon bakelite à vis et capsule autoclavable capacité 250 ml
35	10	Flacons tibulaires basse 10 1	Flacons bouchés et gradués à tubulaire basse et capuchon (verre borosilicaté) capacité 10 1

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
36	1000	Tubes à hémolyse	Tube à hemolyse en verre borosilicaté 12 x 65 mm
37	1000	Tube à vis	Tube à essais, fond rond, col à vis, capsule aluminium et joint caoutchouc, verre pyrex 16 x 160 mm
38	20	Eprouvette en polypropytène	Eprouvette graduée en polypropytène translucide et stérilisable à 195°C capacité 250 ml
39	20	Eprouvette	idem capacité 500 ml
40	20	Eprouvette	idem capacité 1000 ml
41	20	Eprouvette	idem capacité 2000 ml
42	10	Fioles à filtrer	Fiole à filtrer en verre pyrex capacité 1000 ml
43	20	Becher polypropylène 100 ml	Becher polypropylène gradué à bec forme haute capacité 100 ml
44	20	Becher polypropylène	idem capacité 250 ml
45	20	Becher polypropylène 600 ml	idem capacité 600 ml
46	30	Becher polypropylène 2000 ml	idem capacité 2000 ml
47	200	Boites de Roux	Flacons plats disymétriques, pour culture en position couchée col incliné en verre borosilicaté capacité 600 ml
48	20	Entonnoir	Entonnoir verre borosilicate angle 60° tige courte diamètre 100 mm
49	20	Entonnoir	idem diamètre 200 mm
50	300	Flacons en polypropylène	Flacons en polypropylène ou teflon avec bouchons à vis étanche et stérilisables.

LOT. N°6

MATERIEL DE FILTRATION ET RECIPIENTS INOX

L'offre devra comprendre, quand cela s'impose la formation du personnel d'exploitation et d'entretien et les pièces détachées nécessaires pour 2 ans de fonctionnement.

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
1	1	Support filtre 293 mm	Support filtre en acier inoxydable 316 avec grille support revetue de Teflon et raccords sanitaires monté sur pied. Joints toriques en teflon. Appareil utilisé pour l'ultra filtration avec filtre de diamètre 293 mm. Surface de filtration environ 470 cm2. Possibilité d'intercaler des prefiltres. Raccord tri-champ 1 1/2" avec adapatateur pour tuyau de diamètre inférieur à 14 mn - Pression maximale de service 7 bars. Stérilisable à l'autoclave. Livraison avec accessoires suivants : 2 réservoirs présurisables en acier inox avec raccords rapides de capacité 20 litres environ. Pression d'épreuve 10 bars. Autoclavables munis de manomètres en acier inox. 2 tuyaux de 2 m environ pour mettre les réservoir sous pressions avec raccords rapide. 10 raccords tri-clamp en acier inox avec olive crantée pour tuyau de 10 à 13 mm (avec collier) Situation : pièce 10
2	2	Support filtres 142 mm	Description : voir art. n°1 lot 6 Excepté les dimensions : Diamètre 142 mm - Surface de filtration environ 100 cm2 environ. Les accessoires sont identiques Situation pièces 9 et 10

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
3	2	Support filtre cartouche	Support pour filtres cartouches en acier inoxydable 316 avec raccords sanitaire et poli electrolytique. Raccords triclamp à l'entrée et à la sortie situées au 2 extrémités du support. Livrés avec tous les accessoires nécessaires au fonctionnement et notamment : Joints - manomètre - purge - support mural L'ensemble doit être autoclavable Longueur : pour filtres de 78 cm Chaque support filtre est livré avec 2 flexibles avec raccords rapides pour mise sous pression et 2 réservoirs de 20 litres avec raccords rapides en inox et pressurisables (épreuve 10 bars) Situation : pièce 6
4	1	Récipient inox de 100 litres environ	Récipient sous pression de 100 litres environ (80 à 100 l) en acier inoxydable 316 monté sur roue. Ouverture supérieure constituée d'un couvercle à charnière verrouillé par une bride de serrage sanitaire. Vidange par le bas avec raccords à bride. Ce récipient est autoclavable en entier. Manomètre - Pression 7 bar. Utilisable sous vide. purge et soupape. Livré avec tous les accessoires de fonctionnement et de raccordement. Situation : pièce 6
5	1	Appareil à concentration	Système complet d'ultra filtration à cassette permettant la concentration de virus composé de : - Une cellule d'ultrafiltration en acier inox à raccord triclamp autoclavable avec tous ses accessoires et raccords pour tuyau de diamètre intérieur 14 mm avec collier de serrage - vannes à membranes joints et manomètres à membrane de 0 à 6 bars. Clé dynamométrique et douilles de clef dynamométrique. - Un système de circulation complet avec tuyaux autoclavables et pompe péristallique de débit suffisant.

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
5		suite	- Un ensemble de 4 cassettes pour la séparation de particules de P.M. - 380 à 470 x 10^6 Dalton. Les cassettes ont une surface de filtration de 4500 cm2 environ. Situation : pièce n°6
6	1	Récipient double paroi et agitation	Situation : pièce n°16 Cuve en acier inoxydable poli intérieur miroir avec double paroi permettant le refroidissement par circulation d'eau froide. Système d'agitation étanche stérilisable avec la cuve - piquages sur l'enveloppe et le réservoir. Dispositif de vidange avec raccord rapide et vanne biologique stérilisable. Capacité 99 litres environ monté sur roulettes autoblocantes. Raccords rapides de stérilisation sur la cuve et la double enveloppe avec flexibles de raccordement. Manomètre pour pression de 3 bars. Soupape de sécurité à 1,5 bar. Remplissage par le haut soit par couvercle basculant soit par orifice supérieur avec raccord rapide et vanne biologique stérilisable.
7	1	Système de filtration	Système spécifique de filtration, concentration par procédé CARBOSEP, d'ultrafiltration tangentielle se composant de membrane tubulaire assemblée en faisceaux parallèle dans des modules en acier inox La taille de l'installation est de type pilote- industriel comportant un bâti métallique avec 2 modules en acier inox et un système de pompe et de vannes nécessaires pour opérations d'ultrafiltration. Le pouvoir de coupure des membranes sera précisé dans l'offre et devra permettre différentes opérations chaque référence sera chiffrée en option.

.../...

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
7		suite	L'appareil devra pouvoir être stérilisé sous pression par branchement raccord rapide pression et t° (121° - 2 bars). Le volume horaire traité par l'appareil avec chaque membrane affecté en option devra être précisée dans l'offre.

LOT. N°7

APPAREILLAGE A FLUX LAMINAIRE

L'offre devra comprendre la formation du personnel d'exploitation et d'entretien et les pièces détachées (comprenant au moins un jeu de filtre de rechange) nécessaires pour deux ans de fonctionnement.

Délai de livraison : 4 mois.

N°	Quantité	Appareil	Spécifications
1	2	Hotte à flux laminaire vertical	Situation : pièces 9 et 16 Hotte à flux laminaire à 2 postes montée sur pieds. Flux liminaire vertical avec recirculation de l'air circulant. Filtration absolue - Vitesse de soufflage réglable entre 0,3 et 0,7 m/s. Classe 100 (99, 997 % pour les particules de 0,3 μ) Eclairage par tubes fluorescents (800 LUX). Surface de travail minimale (Longueur 2 m minimum (profondeur 0m 75 Hauteur 77 cm - Surface INOX prévue pour travailler avec gaz et électricité. Manomètre indiquant le colmatage des filtres. Plateau de récupération des liquides écoulés Lèvres d'aspiration devant et derrière le plan de travail. Voltage 220 V.
2	1	Plafond à flux laminaire	Situation : pièce n°6 Plafond à flux laminaire vertical composé d'un bâti avec rideaux plastiques suspendus transparents. Soufflage à vitesse réglable entre 0,3 et 0,7 m/s. Classe 100 (voir ci-dessus) Manomètre indiquant le colmatage des filtres. 4 points d'encrage. Crochets et chaines de suspension Dimension : 150 x 150 cm. Voltage : 220 V Eclairage par tubes fluorescents (= 800 lux)
3	4	Hottes à flux laminaire mobile	Poste de travail volant à flux laminaire, type Spot = conçus pour manipulations de pièces en milieu stérile et hors poussière livré avec support téléscopique à roulettes. Qualité de filtration = 99,99 %

LOT. N°8

PRODUITS CHIMIQUES

Délai de livraison : 4 mois

Pour chaque produit proposé le fournisseur devra préciser la référence et le catalogue.

N°	Quantité	Produit
1	50v 1 Kg	Saccharose pour usage biochimique et microbiologique
2	50x 1 Kg	Socium hydroxyde en paillette
3	50 Kg	Sodium chlorure très pur
4	5 Kg	Hydroxyde de potassium
5	5 Kg	Chlorure de potassium
6	2 Kg	Dihydrogenophosphate de sodium (phosphate monosadique)
7	2 Kg	Hydrogenophosphate disodique
8	2 Kg	Dehydrogenophosphate de potassium (phosphate monopotassique)
9	2 Kg	Clorure de calcium
10	2 Kg	Chlorure de magnésium
11	2 Kg	Sulfate de magnésium
12	2 Kg	Bicarbonate de Na
13	1 Kg	Citrate trisodique
14	3 1	Acide sulfurique
15	3 1	Acide chlorhydrique pur
16	2 1	Acide acétique
17	500 g	Acide citrique
18	500 g	Acide borique

.../...

N°	Quantité	PRODUIT
19	250 g	Glycocolle
20	100 g	L.hislidine
21	100 g	L Arginine H cl
22	100 g	L Alinine
23	250 g	L cystine
24	100 g	L tyrosine
25	100 g	Leucine
26	100 g	L isoleucine
27	100 g	L lysine
28	100 g	L methionine
29	100 g	L phénylalanine
30	100 g	Thréonine
31	100 g	L tryptophane
32	100 g	L.Valine
33	100 g	Nicotinamide
34	100 g	Penthotenate de calcium
35	100 g	Pyridoxal H cl
36	100 g	Thionine H cl
37	100 g	Riboflavine
38	100 g	Chlorure de choline
39	100 g	A folique
40	100 g	D biotine
41	100 g	Inositol
42	1000 g	L glutamine
43	2 Kg	Lactose
44	5 Kg	Glucose anhydre
45	10x 25 g	Agarose

.../...

N°	Quantité	PRODUIT
46	2 Kg	Bouillon tryptone phosphate broth
47	2 Kg	Bouillon thioglycolate
48	2 Kg	Bouillon trypticase Soja
49	800 g	Gelatine poudre
50	2 Kg	Hydrolysat de lactalbumine
51	2 Kg	Tricine
52	500 g	Albumine bovine purifie fraction V
53	500 g	Trypsine
54	300 g	D. EAE (Dex tran)
55	2x 100 ml	D M S O Dimethylsulfoxyde
56	500 ml	Tween 20
57	500 ml	Twenn 80
58	125 g	Trypan bleu
59	25 g	Rouge de Phénol
60	25 g	Cristal violet
61	25 g	Rouge neutre
62	100 g	Gentamycine
63	100 g	Mycostatine
64	100 g	Fungizone
65	100 g	Penicilline G
66	100 g	Kananycine
67	100 g	Dihydrostreptomycine Conjugué antinucléo-capsidique rage (Pasteur)
68	10 coffrets	pour culture cellulaire
69	10 coffrets	pour diagnostic
70	20 l	Acétone purifié
71	50 l	Alcool Absolu
72	50 l	Alcool 95°

.../...

N°	Quantité	PRODUIT
73	3 l	Methanol
74	100 l	Formol technique
75	200x5 ml	Beta propiolactone
76	100 g	O P D (Orthophenyldiamine)
77	2 Kg	Sorbitol
78	200 l	D M E M (poudre pour)...
79	200 l	G M E M (poudre pour)...
80	6 l	Serum de veau foetal
81	6 l	Serum de veau nouveau né
82	15 l	Serum de veau normal
83	100 l	Hydroxyde d'alumine
84	150 l	M E M déficient (poudre pour)...
85	500 g	E D T A ou versenate de sodium
86	5 l	Chloroforme

LOT. N°9

MATERIEL FONGIBLE OU A USAGE UNIQUE

Délai de livraison : 4 mois

N°	Quantité	Spécifications
1	1000 x 2	Tube congelation azote 2 ml
2	250 x 2	Bouchons transparents
3	250 x 2	Bouchons bleus
4	250 x 2	Bouchons verts
5	250 x 2	Bouchons jaunes
6	1000 x 2	Flacons roulants stériles (850 cm2)
7	2000	Flacons pour culture cellulaire 25 cm2
8	1000	Flacons pour culture cellulaire 75 cm2
9	500	Flacons pour culture cellulaire 150 m
10	500	Plaques microtitration avec couvercle
11	500	Plaques microtitration sans couvercle
12	1000	Adhésif pour microplaques
13	Rouleau 2	Adhésif pour microplaques 60 m
14	100 x 2	Chambre L A B T E K
15	100 x 2	Plaque Terasaki
16	500	Plaque microtitration fond en U
17	1000	Boites de petri (plastique diamètre 500 mm)
18	100	Boites (multipuits à 4 trous)
19	100	" " 12 trous
20	1000	Cones pour pipette Eppendorf pipettes à usage unique
21	2000	1 ml graduée en 1/100
22	500	2 ml graduée en 1/100
23	500	5 ml graduée en 1/100
24	500	10 ml graduée en 1/100 Tubes stériles à centrifuger à usage unique en polypropylène avec bouchon visse graduation moyenne fond conique stériles.

.../...

N°	Quantité	Spécifications
25	500	50 ml
26	500	15 ml
27	200	Unités de filtration "FALCON" 150 ml (sans réservoir de collecte 0,22 microns)
28	1500	Boites petri stériles en polystyrène à culture cellulaire Ø = 60 mm h = 15 mm
29	6 x 50	Tubes de Leighton en polystyrène cristal col à vis lamelle plastique résistant à la coloration 93 x 16 mm
30	2000	Sacs poubelle autoclavables à usage unique 50 l minimum
31	500 feuilles	Papier filtre ordinaire disques Ø = 125
		gants de chirurgie en latex stériles en boite de 50 fins grande sensibilité tactile avec manchettes stériles
32	1000	Taille 6
33	1000	Taille 7 idem mais en vinyl
34	1000	Taille 6 - 7
35	1000	Taille 7 - 8 papier PH rouleaux
36	50 rouleaux	Papier PH rouleaux 6 - 8 avec 0,2 sensibilité
37	10 rames	Papier joseph (rames de 800 feuilles)
38	100 rouleaux	Papier indicateur stérilisation rouleaux
39	Feuilles 5 x 100	Feuilles de notation de laboratoire en polypropylène imperméable résitants aux produits chimiques pour crayons feutres
40	2 x 50 m	Tuyau souple silicone rhodonsil rouleaux de 50 m Ø = 8 x 12 mm
41	2 x 50 m	idem Ø = 8 x 14 mm
42	1 x 50 m	idem Ø = 2 x 4 mm

.../...

N°	Quantité	Spécifications
	1000	Seringues stériles à usage unique - 1 ml avec auguille pour inoculation - type tuberculine
		Même article mais capacité :
	300	- 2 ml, avec aiguille montée
	300	- 5 ml
	300	- 10 ml
		Aiguille stérile à usage unique paroi normale - fuseau normal - h x Ø
	1000	16 x 0,5 mm -
	1000	25 x 0,6 mm
	1000	38 x 0,8 mm
	1000	Dispositif de prise de sang type vacutainer 10 ml avec un support aiguille par 10 vacutainers
	1500	Aiguilles pour vacutainer 38 mm x 9/10
	10 x 100	Lames de bistouri N°23
	2 paires	Gants de protection mains et bras pour travaux à haute température
	1000	Filtre à air à usage unique type pneumofiltre avec 2 embouts canelés

ROYAUME DU MAROC

Ministère de l'Agriculture
et de la Réforme Agraire

SOCIETE BIOPHARMA

A P P E L D' O F F R E S

POUR LA FOURNITURE ET L'INSTALLATION DES EQUIPEMENTS
ET MATERIELS D'UN LABORATOIRE DE PRODUCTION ET DE
CONTROLE DE VACCINS VETERINAIRES

****

UNITE DE PRODUCTION DE VACCIN CONTRE LA RAGE

ANNEXE TECHNIQUE

Cadre de bordereau de prix et de détail estimatif.

Lot 1

CADRE DE BORDEREAU DE PRIX ET DE DETAIL ESTIMATIF

Poste no.	Designation	Prix unitaires		Quantité à livrer	Prix totaux	
		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)
1	AUTOCLAVE HORIZONTAL			1		
2	FOUR PASTEUR			1		
				Totaux		

Arrêté le montant du présent détail estimatif à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant A

et à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant B.

Fait à ....., le 198

le soumissionnaire (signature)

Lot 2

CADRE DE BORDEREAU DE PRIX ET DE DETAIL ESTIMATIF

Poste no.	Designation	Prix unitaires		Quantité à livrer	Prix totaux	
		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)
1	CONGELATEUR A - 18°C			1		
2	CONGELATEUR A - 80°C			1		
3	MACHINE A CONGELER LES CELLULES			1		
4	CONGELATEUR A -80 AVEC INJECTION CO2			1		
				Totaux		

Arrêté le montant du présent détail estimatif à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant A

et à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant B.

Fait à ....., le 198

le soumissionnaire (signature)

Lot 3

CADRE DE BORDEREAU DE PRIX ET DE DETAIL ESTIMATIF

Poste no.	Designation	Prix unitaires		Quantité à livrer	Prix totaux		
		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)	
1	pH METRE			1			
2	BALANCE			1			
3	AGITATEUR MAGNETIQUE			1			
4	AGITATEUR MAGNETIQUE			1			
5	UNITE POUR FLACONS ROULANTS			3			
6	POMPE AVEC VARIATION DE VITESSE			1			
7	MICROSCOPE INVERSE			1			
8	MICROSCOPE			1			
9	PHOTOMETRE LED			1			
10	CENTRALE DE MESURE + t°			1			
11	TROUSSE MAINTE-NANCE			1			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
12	BALANCE ROBERVAL			1			
13	BALANCE ELECTRONIQUE			1			
14	POMPE A VIDE			1			
15	BAIN MARIE			1			
16	RESISTANCE THERMOSTATEE			1			
17	AGITATEUR TYPE "VORTEX"			2			
18	CENTRIFUGEUSE REFRIGEREE			1			
19	INCUBATEUR A CO2			1			
20	APPAREIL TYPE MULTISKAN			1			
21	AGITATEUR DE PLAQUES			1			
22	PIPETTE TYPE TITERTEK			1			
23	PIPETTE TYPE TITERTEK			1			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
24	ENSEMBLE DE PETIT MATERIEL			1			
				Totaux			

Arrêté le montant du présent détail estimatif à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant A

et à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant B.

Fait à ....., le 198

le soumissionnaire (signature)

Lot 4

CADRE DE BORDEREAU DE PRIX ET DE DETAIL ESTIMATIF

Poste no.	Designation	Prix unitaires		Quantité à livrer	Prix totaux	
		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)
1	GROUPE SEMI HERMETIQUE 4600Fg/h			1		
2	CONDENSEUR A AIR			1		
3	EVAPORATEUR (FRIGORIFERE)			1		
4	VANNE SOLENOIDE			1		
5	FILTRE DESHYDRATEUR			1		
6	VOYANT HUMIDITE,LIQUIDE			1		
7	SEPARATEUR D'HUILE			1		
8	PRESSOSTAT HP			1		
9	PRESSOSTAT BP			1		
10	THERMOSTAT D'AMBIANCE			1		
11	MANOMETRE ASP.			1		
				A reporter		

-	-	-	-	Report			
12	MANOMETRE REF.			1			
13	VANNES D'ISOLE-MENT			8			
14	BOUTEILLE LIQUIDE			1			
15	ECHANGEUR CHALEUR			1			
16	TUYAUTERIE			1 ENSEMBLE			
17	COFFRET METAL			1			
18	SECTIONNEUR 25 A TETRAPOLAIRE			1			
19	SECTIONNEUR 25 A TREPOLAIRES			2			
20	CONTACTEURS 9 A TRIPOLAIRES			2			
21	CONTACTEUR 12 A TRIPOLAIRE			1			
22	RELAIS 1,6 A 2,5A THERMIQUE			1			
23	RELAIS 1 A 1,6 A THERMIQUE			1			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
24	TRANSFORMATEUR			1			
25	COUPE CIRCUIT			10			
26	COUPE CIRCUIT			6			
27	RELAIS AUXILIAIRE			3			
28	CONTACTEUR AUXILIAIRE			3			
29	RELAIS TEMPORISE			2			
30	RELAIS D'AUTOMATISME			2			
31	DISJONCTEURS			6			
32	BOUTON TOURNANT 3 POSITIONS			3			
33	BOUTON TOURNANT 2 POSITIONS			4			
34	VOYANTS VERT LUMINEUX			6			
35	VOYANTS ROUGES LUMINEUX			6			
36	VOYANTS JAUNES LUMINEUX			6			
37	COFFRETS METAL			2			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
38	SECTIONNEURS TETRAPOLAIRES			2			
39	COUPE CIRCUIT STANDARD			20			
40	CONTACTEURS AUXILIAIRES			6			
41	BOUTONS TOURNANTS 3 POSITIONS			3			
42	BOUTONS TOURNANTS 2 POSITIONS			6			
43	VOYANT LUMINEUX VERTS			6			
44	VOYANT LUMINEUX JAUNES			3			
45	REGULATEURS DE TEMPERATURE			2			
46	SONDE PLATINE			2			
47	AEROTHERMES			2			
				Totaux			

Arrêté le montant du présent détail estimatif à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant A

et à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant B.

Fait à ....., le 198

le soumissionnaire (signature)

Lot 5

CADRE DE BORDEREAU DE PRIX ET DE DETAIL ESTIMATIF

Poste no.	Designation	Prix unitaires		Quantité à livrer	Prix totaux	
		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)
1	FLACONS 5 L			10		
2	FLACONS 10 L			5		
3	FLACONS 20 L			10		
4	FLACONS 1000 ML			100		
5	FLACONS 500 ML			100		
6	BOITES DE PETRI			200		
7	ERLENMEYER 1000 ML			20		
8	BECHER 2000 ML			20		
9	BECHER 1000 ML			20		
10	BECHER BAS 500ML			20		
11	BECHER HAUT 500 ML			20		
				A reporter		

-	-	-	-	Report			
12	BOITES DE ROUX			100			
13	EPROUVETTES GRADUEE 2000 ML			10			
14	EPROUVETTE GRADUEE 1000 ML			30			
15	EPROUVETTE GRADUEE 500 ML			30			
16	EPROUVETTE GRADUEE 100 ML			30			
17	PIPETTES 25 ML			100			
18	PIPETTES DE 10 ML			200			
19	PIPETTES DE 5 ML			200			
20	PIPETTES DE 2 ML			500			
21	PIPETTES DE 1 ML			500			
22	BALLONS A FOND PLAT 2000 ML			20			
23	BALLON FOND PLAT 1000 ML			20			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
24	BALLON A FOND PLAT 250 ML			20			
25	TUBE A ESSAIS 18 X 180			200			
26	TUBES A ESSAIS 26 X 200			200			
27	CANNE DE VERRE			20 KG			
28	LAMES PORTE OBJET			1.000			
29	LAMELLES			1.000			
30	FIOLEJAUGEE 100 ML			10			
31	FIOLE JAUGEE 1.000 ML			10			
32	CRISTALLISOIRS 1.500 ML			10			
33	CRISTALLISOIRS 3.000 ML			10			
34	FLACONS 250 ML			100			
35	FLACONS TUBULURE BASSE			10			
36	TUBES HEMOLYSE			1.000			
37	TUBES A VIS			1.000			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
38	EPROUVETTE POLYPROPYLENE			20			
39	EPROUVETTE 500 ML			20			
40	EPROUVETTE 1000 ML			20			
41	EPROUVETTE 2000 ML			20			
42	FIOLES A FILTRER			10			
43	BECHER 100 ML POLYPROPYLENE			20			
44	BECHET 250 ML POLYPROPYLENE			20			
45	BECHER 600 ML POLYPROPYLENE			20			
46	BECHETS 2000 ML POLYPROPYLENE			30			
47	BOITES DE ROUX			200			
48	ENTONNOIR 100 MM			20			
49	ENTONNOIR 200 MM			20			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
50	FLACONS A VIS			300			
				Totaux			

Arrêté le montant du présent détail estimatif à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant A

et à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant B.

Fait à ....., le 198

le soumissionnaire (signature)

Poste no.	Designation	Prix unitaires		Quantité à livrer	Prix totaux	
		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)
1	SUPPORT FILTRE 293 MM			1		
2	SUPPORT FILTRE 142 MM			2		
3	SUPPORT FILTRE CARTOUCHE			2		
4	RECIPIENT INOX 100 L			1		
5	APPAREIL A CONCENTRATION			1		
6	RECIPIENT DOUBLE PAROI			1		
7	SYSTEME DE FILTRATION			1		
				Totaux		

Arrêté le montant du présent détail estimatif à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant A

et à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant B.

Fait à ....., le 198

le soumissionnaire (signature)

Lot 7

CADRE DE BORDEREAU DE PRIX ET DE DETAIL ESTIMATIF

Poste no.	Designation	Prix unitaires		Quantité à livrer	Prix totaux		
		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)	
1	FLUX LAMINAIRE VERTICAL			2			
2	PLAFOND A FLUX LAMINAIRE			1			
3	FLUX LAMINAIRE MOBILE			4			
				Totaux			

Arrêté le montant du présent détail estimatif à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant A

et à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant B.

Fait à ....., le 198

le soumissionnaire (signature)

Lot 8

CADRE DE BORDEREAU DE PRIX ET DE DETAIL ESTIMATIF

Poste no.	Designation	Prix unitaires		Quantité à livrer	Prix totaux		
		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)	
1	SACCHAROSE			50 KG			
2	SODIUM HYDROXYDE			50 KG			
3	SODIUM CHLORURE			50 KG			
4	HYDROXYDE DE POTASSIUM			5 KG			
5	CHLORURE DE POTASSIUM			5 KG			
6	PHOSPHATE MONOSODIQUE			2 KG			
7	PHOSPHATE DISODIQUE			2 KG			
8	PHOSPHATE MONOPOTASSIQUE			2 KG			
9	CHLORURE DE CALCIUM			2 KG			
10	CHLORURE DE MAGNESIUM			2 KG			
11	SULFATE DE MAGNESIUM			2 KG			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
12	BICARBONATE LE SODIUM			2 KG			
13	CITRATE TRISODIQUE			1 KG			
14	ACIDE SULFURIQUE			3 L			
15	ACIDE CHLORHYDRIQUE			3 L			
16	ACIDE ACETIQUE			2 L			
17	ACIDE CITRIQUE			500 G			
18	ACIDE BORIQUE			250 G			
19	GLYCOCOLLE			250 G			
20	HISTIDINE			100 G			
21	L. ARGININE			100 G			
22	L. ALANINE			100 G			
23	L. CYSTINE			250 G			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
24	L.TYROSINE			100 G			
25	LEUCINE			100 G			
26	L.ISOLEUCINE			100 G			
27	L. LYSINE			100 G			
28	L. METHIONINE			100 G			
29	L. PHENYLALANINE			100 G			
30	THREONINE			100 G			
31	TRYPTOPHANE			100 G			
32	L. VALINE			100 G			
33	NICOTINAMIDE			100 G			
34	PENTHOTENATE DE CALCIUM			100 G			
35	PYRIDOXAL			100 G			
36	THIONINE			100 G			
37	RIBOFLAVINE			100 G			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
38	CHLRORURE DE CHOLINE			100 G			
39	ACIDE FOLIQUE			100 G			
40	D.BIOTINE			100 G			
41	INOSITOL.			100 G			
42	L. GLUTAMINE			1000 G			
43	LACTOSE			2 KG			
44	GLUCOSE ANHYDRE			5 KG			
45	AGAROSE			10 X25 G			
46	BOUILLON TRYPTONE PHOSPHATE.			2 KG			
47	BOUILLON THIOGLYCOLATE			2 KG			
48	BOUILLON TRYPTICASE SOJA			2 KG			
49	GELATINE			800 G			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
50	HYDROLYSAT LACTALBUMINE			2 KG			
51	TRICINE			2 KG			
52	ALBUMINE			500 G			
53	TRYPSINE			500 G			
54	DEXTAN (DEAE)			300 G			
55	D- M - S - O			2 X 100 ML			
56	TWEEN 20			500 ML			
57	TWEEN 80			500 ML			
58	TRYPAN BLEU			125 G			
59	ROUGE PHENOL			25 G			
60	CRISTAL VIOLET			25 G			
61	ROUGE NEUTRE			25 G			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
62	GENTAMYCINE			100 G			
63	HYCOSTALINE			100 G			
64	FUNGIZONE			100 G			
65	PENICILLINE G			100 G			
66	KANAMYCINE			100 G			
67	DIHYDROSTREPTO-MYCINE			100 G			
68	CONJUGUE CELLULES			10 COFFRETS			
69	CONJUGUE DIAGNOSTIC			10 COFFRETS			
70	ACETONE PURIFIE			20 L			
71	ALCOOL ABSOLU			50 L			
72	ALCOOL 95°C			50 L			
73	METHANOL			3 L			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
74	FORMOL TECHNIQUE			100 L			
75	BETA PROPIO LACTONE			200 X 5 ML			
76	O.P.D.			100 G			
77	SORBITOL			2 KG			
78	D.M.E.M			200 L			
79	G.M.E.M.			200 L			
80	SERUM VEAU FOETAL			6 L			
81	SERUM VEAU NOUVEAU NE			6 L			
82	SERUM VEAU			15 L			
83	HYDROXYDE D'ALUMINE			100 LITRES			
84	M.E.M. DEFICIENT			150 LITRES			
85	E.D.T.A.			500 G			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
86	CHLOROFORME			5 L			
				Totaux			

Arrêté le montant du présent détail estimatif à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant A

et à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant B.

Fait à ....., le 198

le soumissionnaire (signature)

Lot 9

CADRE DE BORDEREAU DE PRIX ET DE DETAIL ESTIMATIF

Poste no.	Designation	Prix unitaires		Quantité à livrer	Prix totaux	
		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)		Prix A (franco destination)	Prix B (montage)
1	TUBES A CONGELATION			2000		
2	BOUCHONS TRANSPARENTS			500		
3	BOUCHONS BLEUS			500		
4	BOUCHONS VERTS			500		
5	BOUCHONS JAUNES			500		
6	FLACONS ROULANTS			2000		
7	FLACONS 25 CM2			2000		
8	FLACONS 75 CM2			1000		
9	FLACONS 150 CM 2			500		
10	PLAQUES MICROT AVEC COUVERCLE			500		
11	PLAQUES MICROTI			500		
				A reporter		

-	-	-	-	Report			
12	ADHESIF POUR MICROPLAQUES			1000			
13	ADHESIFS EN ROULEAU			2			
14	CHAMBRES LABTEK			200			
15	PLAQUES TERASAKI			200			
16	PLAQUES FOND EN U			500			
17	BOITES DE PETRI 100 MM			1000			
18	BOITE A 4 TROUS			200			
19	BOITES A 12 TROUS			200			
20	CONES POUR PIPETTES			1000			
21	PIPETTE 1 ML			2000			
22	PIPETTE 2 ML			500			
23	PIPETTE 5 ML			500			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
24	PIPETTES 10 ML			500			
25	TUBE A CENTRIFUGER 50 ML			500			
26	TUBES A CENTRIFUGER 15 ML			500			
27	UNITES FILTRATION			200			
28	BOITE DE PETRI 60 MM			1500			
29	TUBES LEIGHTON			300			
30	SACS POUBELLES			2000			
31	DISQUE PAPIER FILTRE			500			
32	GANTS LATEX N° 6			1000			
33	GANTS LATEX N° 7			1000			
34	GANTS VINYL N° 6-7			1000			
35	GANTS VINYL N° 7-8			1000			
36	PAPIER pH			50 ROULEAUX			
37	PAPIER JOSEPH			10 RAMES			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
38	PAPIER INDICATEUR STERILISATION			100 ROULEAUX			
39	FEUILLES POLYPROPYLENE			500			
40	TUYAU RHODORSIL 8 X 12			100 M			
41	TUYAU RHODORSIL 8 X 14			100 M			
42	TUYAU RHODORSIL 2 X 4			50 M			
43	SERINGUES TUBERCULINE			1000			
44	SERINGUES 3 ML			300			
45	SERINGUES 5 ML			300			
46	SERINGUES 10 ML			300			
47	AIGUILLES			1000			
48	AIGUILLES			1000			
49	AIGUILLES			1000			
				A reporter			

-	-	-	-	Report			
50	DISPOSITIF PRISE DE SANG			1000			
51	AIGUILLES POUR ART. 50			1500			
52	LAMES BISTOURI			1000			
53	GANT ISOLANTS			2 PAIRES			
54	FILTRE A AIR			1000			
55							
				Totaux			

Arrêté le montant du présent détail estimatif à la somme de:

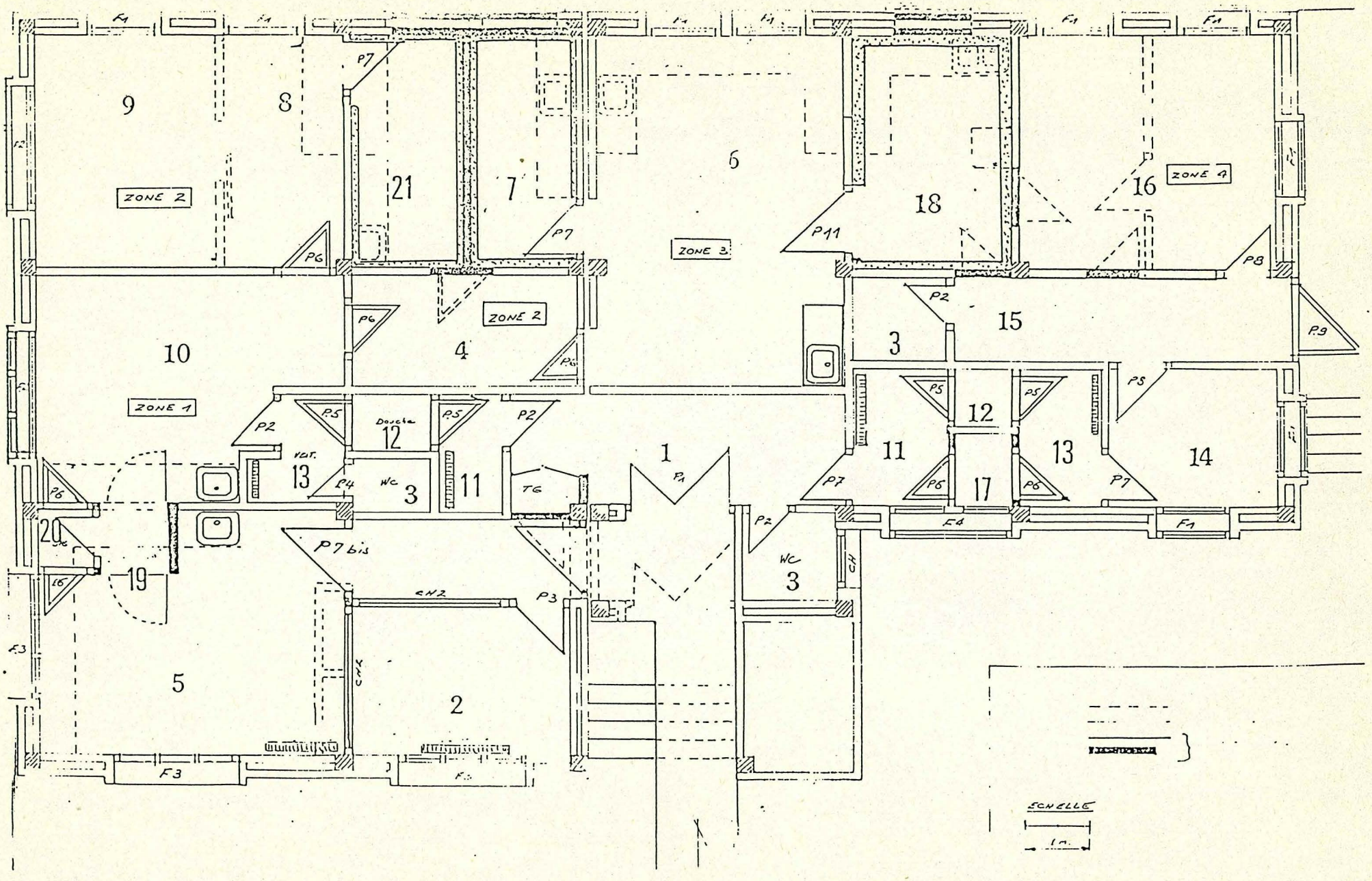
..... (en toutes lettres) pour le montant A

et à la somme de:

..... (en toutes lettres) pour le montant B.

Fait à ....., le 198

le soumissionnaire (signature)



PLAN DU LABORATOIRE

LOUTFI Chafika

Ecole Nationale Véterinaire de Lyon

Laboratoire de microbiologie- Immunologie

Maitre de stage:

Docteur ASSO. J

RAPPORT DE STAGE

ETUDE DU VIRUS POX DE LA VARIOLE DU DROMADAIRE

1988

REMERCIEMENTS

A Monsieur ASSO.J

Directeur de recherche INRA

Qui nous a accordé beaucoup de son temps et de sa patience pour nous faire partager ses connaissances et son enthousiasme.
Notre reconnaissance .

A Monsieur MOUSSA
Chef du service de virologie au LNPB

Pour le temps précieux qu'il nous a consacré et pour ses précieux conseils .
Sincères remerciements.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I- Isolement de mutants CPV thermostables

1-Multiplication du virus in vitro

2-Sélection de virions thermostables

3-Clonage par la technique de la dilution limite

II- Etude structurale et immunogéne des protéines

1-Electrophorése sur gel polyacrylamide

2-Immunoélectrotransfert

III-Production d'antiserum

1-Sérum anti-variolique

2-Sérum anti IgG de chameau

IV-Conclusion et perspective

INTRODUCTION

Une étude sur l'isolement, l'identification et la caractérisation du virus Pox de la variole du dromadaire "souche MAROC" a été dejà realisée au Laboratoire National de Production de vaccins véterinaires à Rabat; dans le but de mettre en place une stratégie prophylactique contre la variole du dromadaire qui reste un fléau pour l'élevage camélin

Une étude compléte sur les caractéres culturaux ,structuraux et surtout antigéniques et immunologiques du virus en question s'avére alors nécessaire pour cette pérspective

Notre stage à l'Ecole Nationale Véterinaire de Lyon entre dans un programme de recherche ayant pour but l'apprentissage de certaines manipulations couramment utilisées actuellement pour l'etude des virus et l'enrichissement de nos connaissances scientifiques .On s'est alors proposé:

-De sélectionner une souche de CPV thermostable qui pourra être utilisée dans la préparation d'un vaccin vivant attenué.

-D'etudier les proteines virales par électrophorése sur gel et par immunoélectrotransfert .

-De produire un antiserum contre la variole du dromadaire et des anticorps anti-chameau

Une deuxième partie de notre stage a été réalisée au service de virologie du Laboratoire National de Pathologie Bovine et qui avait pour but essentiel l'initiation à la réalisation des hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux

I- ISOLEMENT DE MUTANTS CPV THERMOSTABLES

1-Multiplication du virus in vitro

* Matériel viral

La souche virale faisant l'objet de cette étude a été isolée en 1984 à lâayoune au MAROC à partir de croutes de lésions épidermiques/séches d'un chameau atteint par la variole cameline.Elle a été cultivée au départ sur des cellules primaires de testiculesd'agneau puis adaptée sur culture de ligneés Vero au Laboratoire National de production de vaccins véterinaires (MAROC).

*Systèmes cellulaires

In vitro ce virus cultive sur de nombreux systémes cellulaires . Nous avons choisi trois types de cellules pour la propagation du virus :

-cellules de cornet nasal de chévre et cellules de cornet nasal de mouton mises en culture par le Dr. ASSO

-Cellules de lignée Vero données par le Dr. MOUSSA (LNPB).

* Effet cytopathogéne

Le virus inoculé pur sur un tapis préalablement établi de cellules de cornet nasal de chévre(chcn) entraine la formation de foyers viraux de forme variable formés par des cellules rondes brillantes dès les 24 heures qui suivent l'infection . Cet effet se géneralise le 3éme jour ,chaque foyer viral donne naissance à une plage de lyse .Le deuxieme passage de virus sur ces mêmes cellules entraine la formation de cellules géantes qui fusionnent

pour donner des plages de syncytium trés vastes .Le même effet cytopathique est observé quand le virus est inoculé dilué à 100 ou 1000 doses inféctieuses/ml .

La coloration au May Grünwald Giemsa (MGG) révele des syncytiums de 20 à 25 noyaux

La précocité de l'effet viral dépend de l'état et de l'âge des cellules infectées ainsi que du temps d'adsorption. Le virus adsorbé au moins 45 min à 37°c entraine un ECP précoce (24 heures) qu'un virus qui n'a pas été adsorbé (48 heures).

* Titrage

Le virus est titré suivant la méthode "tout ou rien" sur des plaques de microtitrage à 96 cupules .La suspension virale est diluée de 10 en 10 dans du milieu à 2% sérum de veau foetal (SVF) puis inoculée sur un tapis de cellules préalablement établi sur une plaque à raison de 0,1 ml/cupule et de 8 cupules par dilution. Seules les dernières dilutions sont retenues (10^{2}---10^{5}). La lecture est effectuée le 7ème jour après coloration des cellules par le MGG ; sont comptées positives les cupules présentant au moins une lésion cellulaire (plage de lyse,syncytium...).Le titre est calculé par la technique de Reed et Muench.Le titre inféctieux de ce virus aprés le premier passage sur chcn est 10^{5} dICT50/ml

2- Sélection de virions thermostables

La suspension virale obtenue aprés 3 cycles de congélation décongélation de cellules infectées est titrée selon le protocole décrit ci dessus puis incubée à une température de 40°c.

Cinq jours aprés l'infection on revéle la présence de foyers viraux formés par des cellules rondes et réfringentes . Le virus

est laissé en incubation à cette température pendant 10 jours pour permettre la selection de virions qui ont pu résister à cette température donc thermostables . Ces virions sont ensuite récoltés au niveau des cupules correspondant aux faibles dilutions là où on a le moins de virus , par une trypsination de cellules . La suspension obtenue est ensuite inoculée à des cellules préformées sur des plaques 24 puits et incubée à la même T°:40°c . Le même procédé est utilisé encore une fois utilisant des boîtes de 25 cm2 de surface pour produire le virus en grande quantité.

* Comparaison des deux souches de virus :virus produit à 37°c et virus produit à 40°c.

Deux boites de cellules de cornet nasal de mouton sont inoculées par le même virus (virus du stock) à raison de 100 doses infectieuses /ml .Le virus est adsorbé pendant 45 mn à 37°c avec agitation chaque 10 mn . Une boite est ensuite incubée à 37°c l'autre à 40°c . Les cellules infectées sont suivies quotidiennement .

Le 3ème jour postinfection on note la présence d'ECP dans les cellules à 37°c ,cet effet se traduit par la formation de gros syncytias sur tout le tapis cellulaire.Sur la culture du virus à 40°c il n' y a pas d'ECP .Le même resultat négatif est noté le 7ème jour d'incubation. Les deux cultures sont alors congelées et décongelées deux fois succéssives puis titrées par la méthode preconisée pour déceler la présence du virus dans la culture à 40°c .

* Résultat

Les cellules de cornet nasal de mouton infectées par le virus à 40°c ne presentent aucune lésion spécifique qui peut être attribuée à un virus . Le titre infectieux obtenu est nul en comparaison avec le virus témoin : virus à 37°c dont le titre est de 10^5 DICT50/ml .

II- ETUDE STUCTURALE ET IMMUNOGENE DES PROTEINES

1- Electrophorèse sur gel polyacrylamide

Nous avons utilisé pour l'étude des proteines structurales du virus pox de la variole du dromadaire ,la technique d'electrophorése verticale sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes et en système discontinu .

Le gel de séparation formé par des pores trés petits permet la

séparation des proteines selon leur poids moléculaire aprés dénaturation par le sodium dodécyl sulfate (SDS)

* Protocole experimental

-Préparation des échantillons:

. La suspension virale

L'echantillon à analyser est constitué par la suspension de virus obtenue aprés trois cycles de congélation décongélation de cellules infectées par le virus pur (pour l'etude des proteines en électrophorése il est nécessaire d' avoir de grandes quantités de virus surtout quand il s'agit de virus qui ne titre pas fort) Cette suspension est clarifiée puis concentrée au polyéthyléne glycol(PEG) 4000 à 30% additionné de NaCl. L'ensemble est gardé une nuit à +4°c puis centrifugé à 3000 tours/mn , le culot est repris dans le tampon de dissociation (composition en annexe)

Les cellules qui ont servi pour l'infection virale sont trypsinées puis centrifugées , le culot est lavé une fois avec du PBS sans cations pour éliminer les traces du milieu de culture . Ces cellules lavées sont mises en suspension dans le tampon de dissociation . Les échantillons sont alors chauffés à 100°c pendant 5 mn avant la migration éléctrophorétique .

-Migration des échantillons

On a fait deux électrophorèses dans des conditions différentes pour le même virus cultivé sur deux substrats différents ,en utilisant un gel à 10% en acrylamyde permettant la séparation de polypeptides de $2\ 10^4$ à $2\ 10^5$ daltons.

-CPV1 :virus cultivé sur cellules Vero ,la migration est effectué sous un voltage de 40 volts pendant une nuit. La révélation des

proteines du gel fixées dans du méthanol à 50% et du glutaraldehyde est assurée par la coloration au bleu de coomassie G250 .

-CPV2 : le même virus que CPV1 mais cultivé sur des cellules chcn. le voltage appliqué dans ce cas est de 120 volts pendant les premiéres 30 mn puis de 200 V pour le reste de la migration (étape de séparation) .La réfrigeration est assurée par la circulation d'eau froideà +4°c le long du gel. Le colorant utilisé dans ce cas est le bleu de coomassie G250 (plus sensible)

-Calcul du poid moléculaire

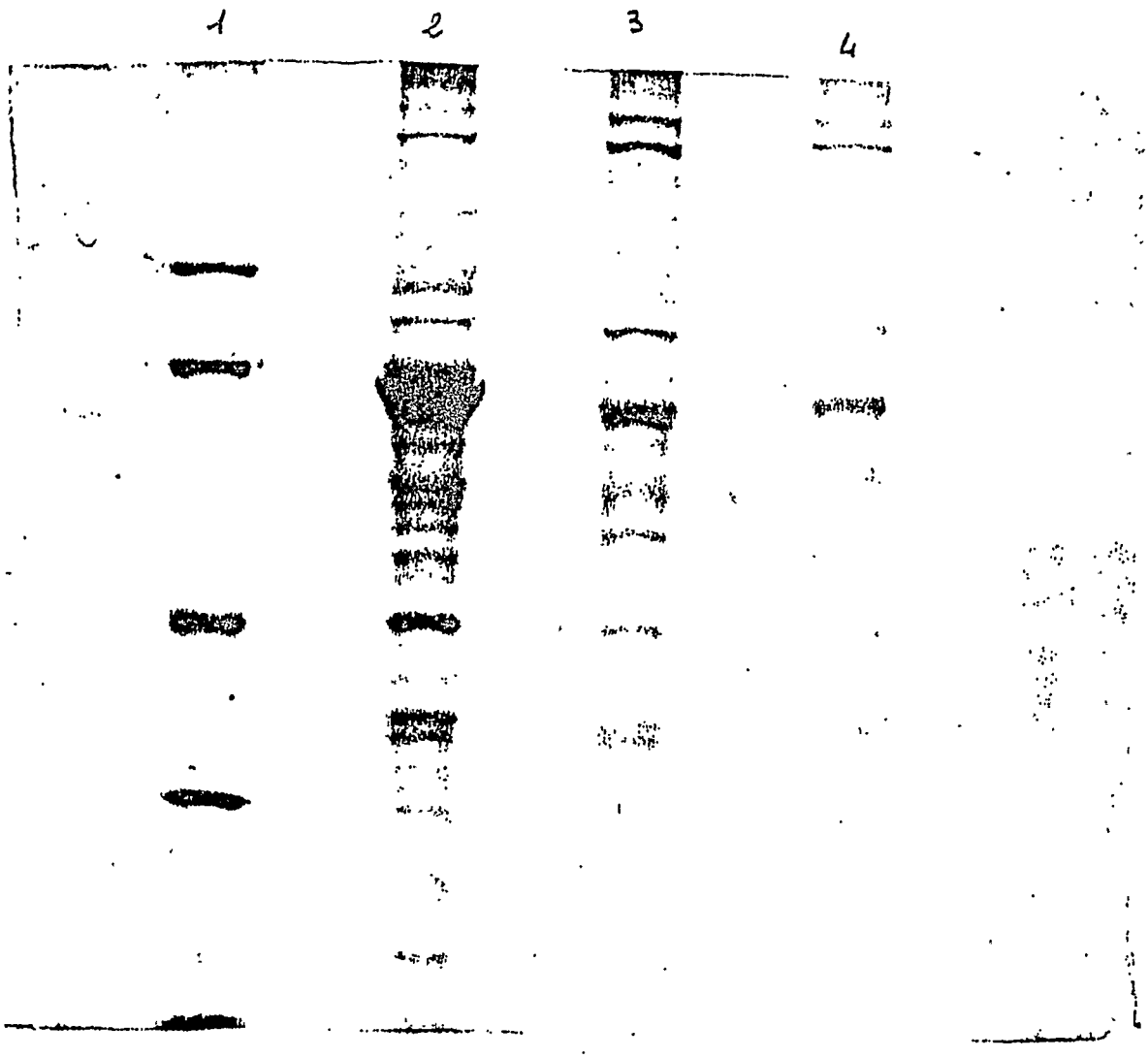
Le poids moléculaire des polypéptides est déterminé graphiquement sur la courbe : log (PM) = f(distance de migration) . Elle est obtenue pour le profil électrophorétique des proteines de poids moléculaire connu (stantards de PM) qui ont migré sur le même gel que les échantillons à analyser

* Resultats

Les deux profils électrophorétiques obtenus pour les deux échantillons de virus sont représentés sur les figures 1 et 2 . Le nombre de polypeptides obtenus est de l'ordre de 7 mais la plupart de ces polypeptides se trouvent sur l'électrophorégramme de cellules non infectées, on peut alors penser qu'il s'agit d'une contamination par les protéînes cellulaires et les protéines du sérum du milieu de culture cellulaire.

Sur le profil électrophorétique du CPV2 (virus multiplié sur chcn) on avait traité les cellules infectées et le surnageant de culture provenant de la lyse cellulaire par congélations-décongélations successives. Le résultat obtenu montre qu'il n'y a pas de différences entre les deux électrophrégrammes. Le procédé préconisé pour la préparation de l'échantillon semble donc efficace.

Fig 1 : Electrophoregramme du virus CPV produit sur cellules VERO.

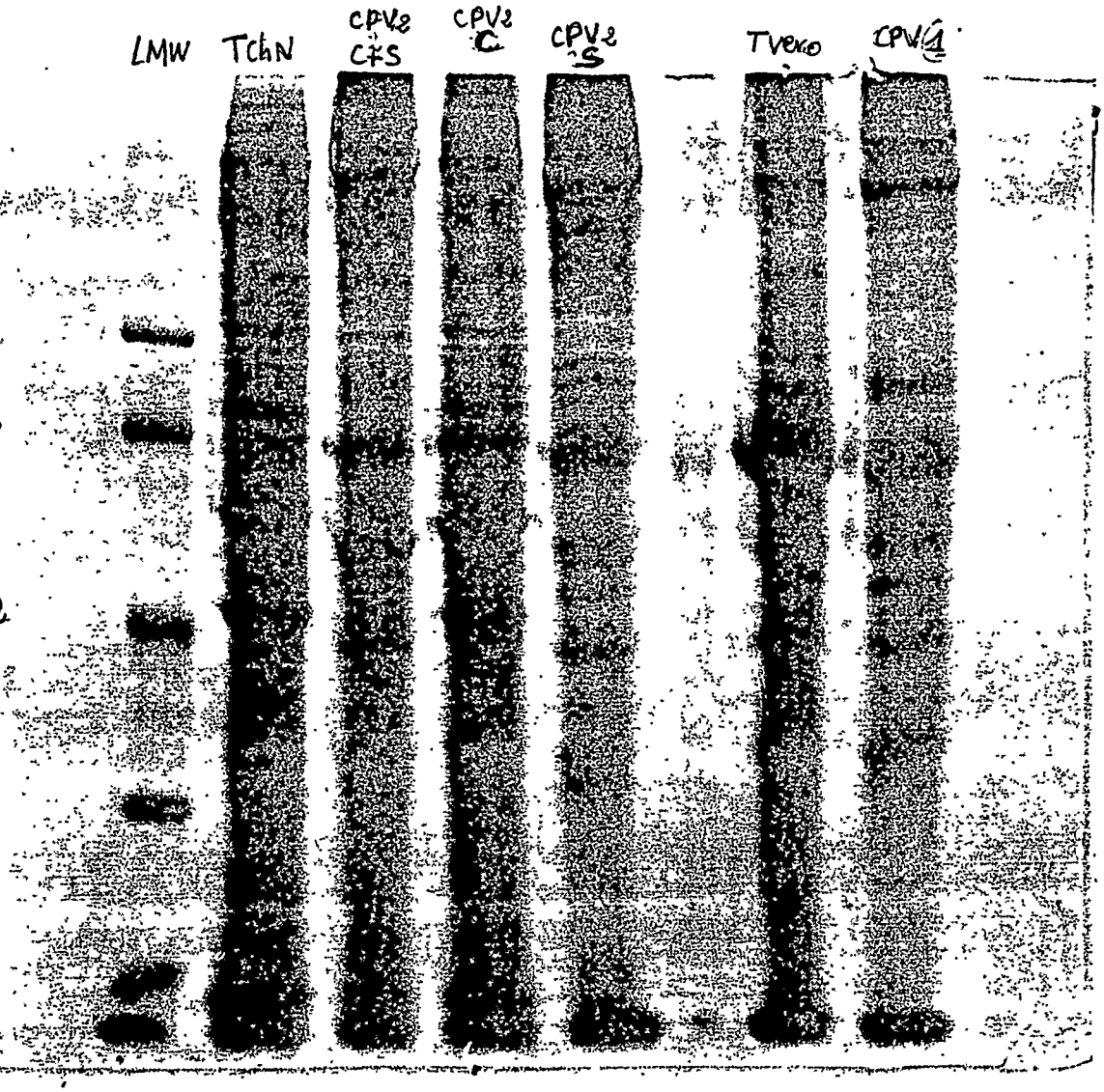


1 : Les standards du poids moléculaire.

2 : cellules vero non infectés (Temoin.

3 : virus CPV pur

4 : " " dilué au $\frac{1}{2}$



LMW : standards de poids moléculaires

TchN : temoin de cellules de cornet nasal de chèvre.

CPV2 : virus produit sur cellules de cornet nasal de chèvre

CPV1 : virus produit sur cellules VERO.

S : surnageant

C : culot.

Fig 2 : Electrophoregramme du virus CPV produit sur cellules de cornet nasal de chèvre et sur cellules vero.

* Discussion

La reproductibilité des résultats d'une électrophorèse sur gel est conditionnée par plusieurs facteurs.

- Le choix de la concentration du gel en acrylamide. Un gel à 10% d'acrylamide reste efficace pour la séparation de protéines de poids moléculaire élevé.

- L'intensité du voltage donc la vitesse de migration. Plus la migration est rapide moins la séparation est bonne.

- La qualité de l'échantillon viral de même que le mode de préparation.

Par faute de références bibliographiques concernant l'étude des protéines de CPV, il nous a été impossible de comparer nos électrophorégramme avec les autres souches de CPV connues. Mais on peut se référer à des virus de la même famille ou du même genre. Dans la famille des Poxvirus, le virus de la vaccine est le mieux étudié, le nombre de polypeptides consituant ce virus déterminé par électrophorèse de gel polyacrilamide est de l'ordre de trente polypeptides dont 4 à 8 possèdent un PM de 8 à 25 KD et 25 un PM de 25 à 200. (2)

2 Immuno-électrotransfert

Le caractère antigénique des protéines est déterminé par la technique d'immunoblotting. Ce qui nous permet de distinguer les protéines antigéniques du virus des protéines cellulaires contaminant la préparation virale ou éventuellement incorporée dans le virion.

L'électrotransfert est réalisé après la migration

électrophorétique sur gel de polyacrilamide selon les conditions décrites.

* Le transfert

Les protéïnes du gel sont mises à transférer sur une feuille de nitrocellulose par électrotransfert en mileu semi-sec sous un voltage de 24 V pendant 1 h 20 mn.

La détection des protéïnes transférées est réalisée par une coloration de rouge Ponceau. Cette coloration est peu sensible et ne permet de détecter que les protéines présentes en forte quantité (le standard de PM par exemple).

* Révélation des protéïnes virales

La distinction entre les protéïnes virales et cellulaires est assurée par l'identification du caractère antigénique de ces protéïnes à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre l'antigène choisi.

Le sérum qu'on a utilisé pour la révélation de ces protéïnes est un sérum de chèvre anti-variole dont les procédures de productionseront décrites dans le troisième chapître de ce rapport.Ce sérum possèdeune activité neutralisante vis à vis de ce virus et l'index de neutralisation est de : 1,2

Cette étape nécessite un certain nombre d'opération successives qui doivent être minutieusement effectuées :

- La partie de la feuille de nitrocellulose contenant les protéïnes virales et celles des cellules non infectées est coupée en petites bandes de 0,5 cm de largeur.

- Les sites non spécifiques sont saturés par incubation de ces bandes dans une solution de lait écrémé à 5% pendant trente minutes.

- Les bandes sont lavées trois fois pendant 20 mn dans du tampon TNT. (composition en annexe)

- Réaction avec l'antisérum dilué au 1/50 puis contact pendant une heure à 37°C sous agitation.

- Lavage trois fois pendant 20 mn dans du TNT pour éliminer les anticorps qui n'ont pas été fixés.

- Incubation pendant 30 mn à 37°C dans une solution du conjugué au 1/1000 constitué d'anticorps anti-IgG de chèvre marqués à la peroxydase.

- Révélation du complexe Ag-Ac-Anti Ac marqués par l'addition du substrat de l'enzyme (qui est le DAB; 3,3-diaminobenzidine tétrahydrochloride) en présence d'H2O2. Le produit de l'hydrolyse donne une coloration brune qui marque l'emplacement de la protéine reconnue par l'anti-sérum.

* Résultats

Le diagramme obtenu est représenté sur la figure 4. On remarque la présence d'une bande colorée qui a réagit avec le sérum correspondant à une protéine de 82 KD et qui est absente sur le diagramme des cellules témoins.

* Discussion

Les poxvirus en général possèdent deux types d'antigènes :

- Antigène nucléo-capsidique (NP). Il joue un rôle dans l'établissement de l'immunité. C'est un antigène commun à tout les poxvirus. Ceci nous laisse penser que la protéine virale de PM 82 KD qu'on a obtenu pourrait être un antigène de nucléo-capside.

- Antigènes solubles (ou antigènes de surface) LS : thermo-

Transfert du 6/7/1988 : Tampon Biolyon modifié

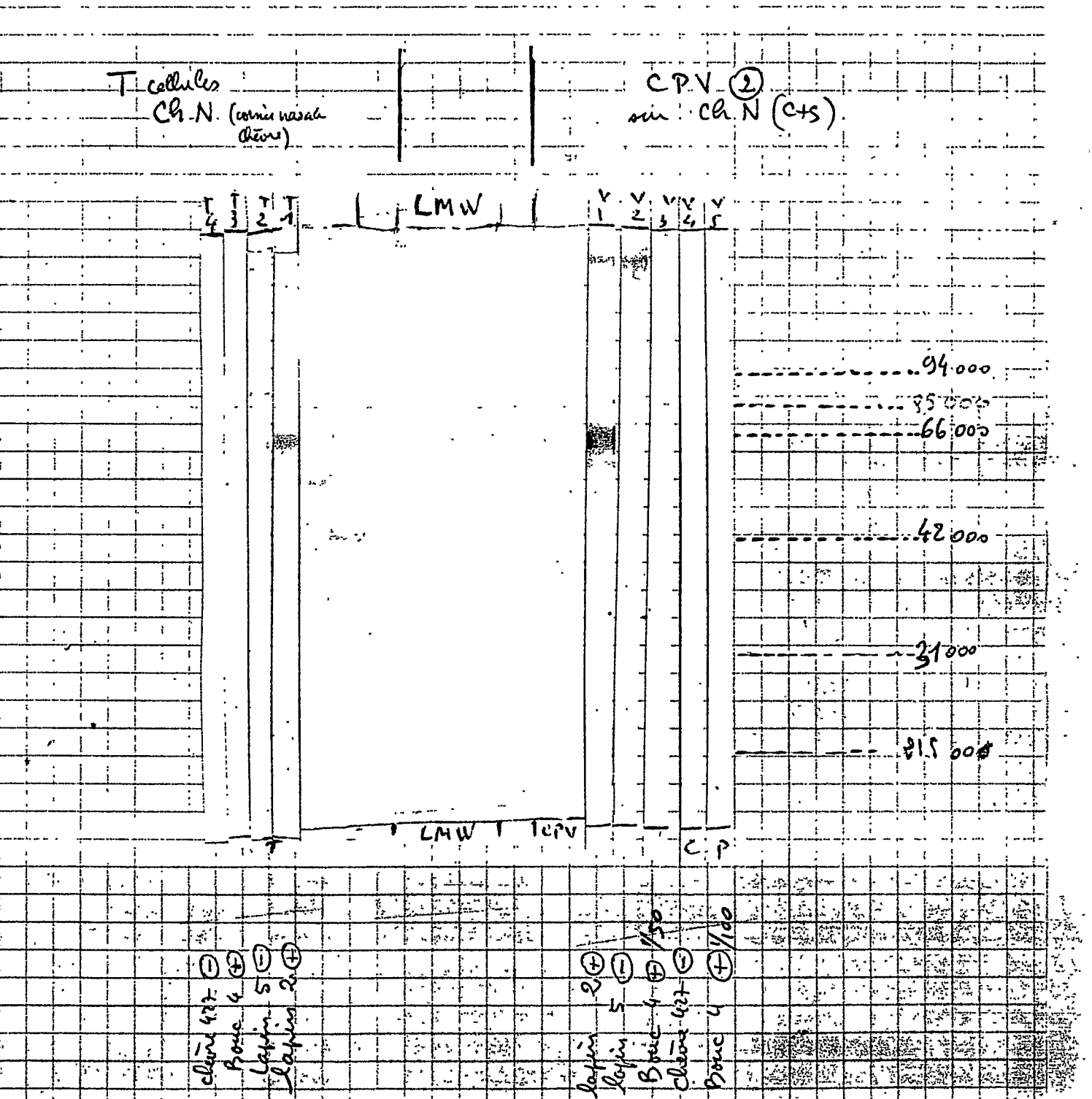


Fig 4 : Immunoélectrotransfert du virus CPV produit sur cellules de cornet nasal de chèvre

labiles et thermostables. Ce sont des antigènes de famille, de sous-famille ou même d'espèce.

- Chez certains poxvirus, surtout de la famille des orthopoxvirus, on trouve l'antigène HA de nature glycoprotéïque qui fait agglutiner les globules rouges de poulet (2).

Tenant compte de ces données, il est vraisemblable que le nombre de polypeptides d'origine virale qu'on a obtenu est fortement sous-estimé du fait que le nombre de polypeptides totaux est lui aussi sous-estimé.

Une étude approfondie concernant la connaissance des caractères culturaux de ce virus, sa cinétique de multiplication est nécessaire pour pouvoir aborder des techniques plus sensibles et plus spécifiques.

III Production d'antisérum

1) Sérum anti-variole

Cette manipulation avait pour objectif l'obtention d'anticorps anti-varioliques spécifiques (neutralisants ou précipitants) qui seront utilisés pour l'exécution de tests sérologiques et qui pourront servir de sérums de référence.

L'inactivation du virus utilisée pour l'immunisation des animaux de laboratoires a été effectuée par chauffage de la suspension virale provenant de la culture cellulaire à une température de 53°C pendant 45 mn.

Une étude sur la thermostabilité du virus de la culture cellulaire a été déjà effectuée et montre que celui-ci perd complétement son pouvoir infectieux après inactivation à 53°C pendant 45 mn.

Le virus inactivé mélangé à égal volume avec un adjuvant de l'immunité est inoculé à des lapins albinos adultes par voie intradermique à des intervalles de temps bien déterminés. Une semaine après la dernière injection les lapins sont sacrifiés.

Avant chaque inoculation un prélèvement de sang est effectué pour la détection d'anticorps neutralisants dans le sérum.

Le même protocole expérimental a été utilisé pour l'immunisation des chevreaux.

Les résultats du test de la séro-neutralisation à virus

variable sur des cellules de chcn montrent qu'il y présence d'anticorps neutralisants dans les sérums des lapins et des chevreaux dès le 20ème j après la première inoculation.

2) Sérum anti-chameau

En l'absence de sérum anti-IgG de chameau marqués, on a pensé à produire des IgG anti-chameau qui seront marqués soit à la peroxydase pour le test ELISA soit à la fluorescéïne pour la technique d'immunofluorescence.

* Purification des IgG de chameau

Les sérum utilisés pour cette technique proviennent de chameaux sains de la région sud du Maroc. Ils sont donnés par MR Delatour du laboratoire de biochimie de l'ENVL.

- Précipitation des IgG par le sulfate d'ammonium SO4(NH4)2). Elle se fait suivant les étapes suivantes :

+ Addition du sulfate d'ammonium saturé à 4,10 Mol/l (pH7) au sérum dans la proportion 2:3 au rythme d'une goutte par seconde sous agitation à +4°C.

+ Contact une heure à +4°C sous agitation.

+ Centrifugation à 5000 tr/mn pendant 10 mn à +4°C. Le culot de centrifugation est dissous dans du PBS de façon à obtenir un volume égal à la moitié du volume initial.

Cette opération est répétée deux fois pour éliminer l'albumine. Certains auteurs recommandent de la répéter trois fois.

- Dialyse pendant 48h contre au moins 100 volumes de PBS en changeant le bain de dialyse une fois au minimum. Cette étape permet l'élimination du sulfate d'ammonium.

- Vérification de la pureté des IgG par une électrophorèse

des proteines seriques selon la méthode HELENA en présence d'un témoin (serum non précipité).

* Resultats

Les resultats obtenus (fig 5) montrent que par cette technique on obtient des IgG assez pures qui peuvent être utilisées pour l'immunisation des animaux choisis pour la production d'anti-IgG de chameaux.

L'étape d'une purification sur colonne de gel de filtration ou autre ne s'avère pas nécessaire.

- Immunisation des animaux

Les IgG obtenues sont mélangées avec un adjuvant d'immunité puis administrées à des lapins albinos adultes par voie intradermique entre les deux épaules et à un chevreau suivant la même voie d'inoculation selon le calendrier suivant :

1ère injection : par voie intradermique avec antigène + adjuvant (50 %, 50 %).

2ème injection : 21 jours après la première réalisée dans les mêmes conditions.

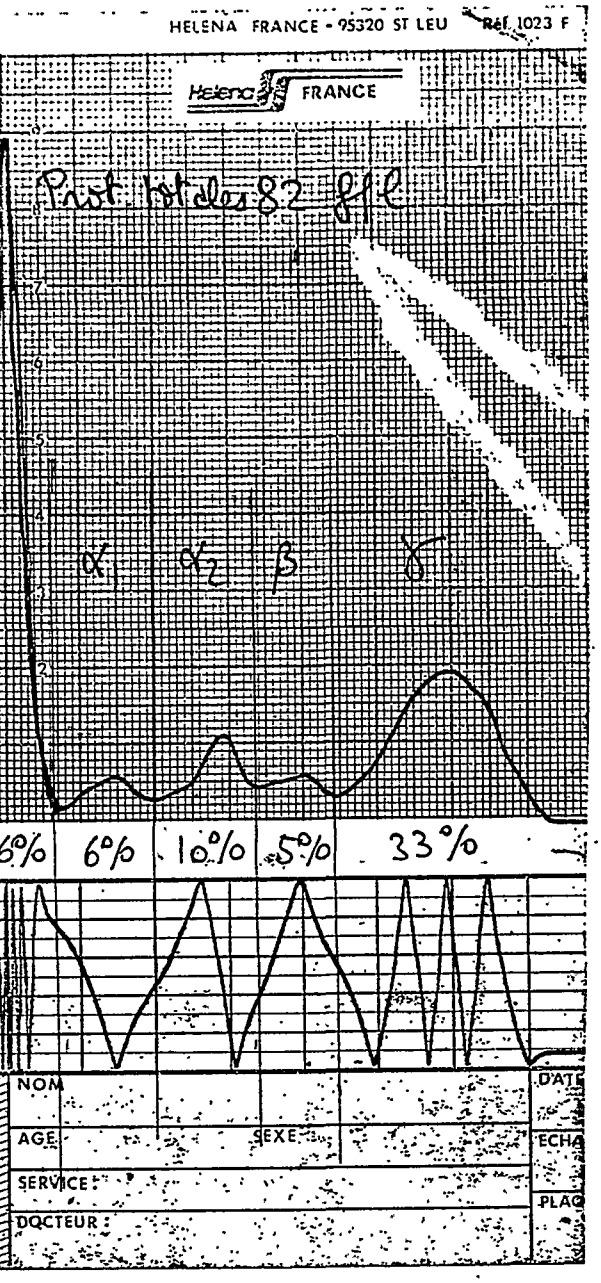
3ème injection : une semaine après la deuxième.

Dernière injection : une semaine après.

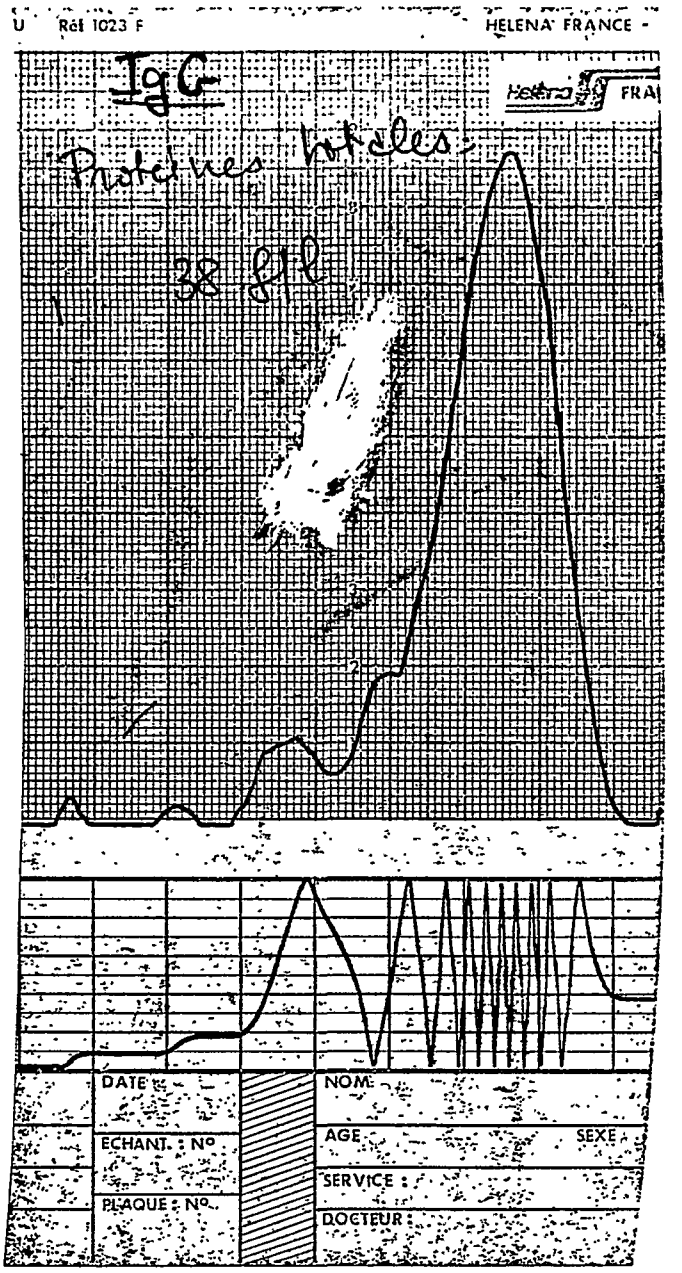
Les lapins sont ensuite sacrifiés et les sérums sont testés par la réaction de précipitation sur gélose.

Ce test révèle la présence de bandes de précipitation de ces sérums avec les IgG de chameau.

Ces sérums anti-chameau seront à leur tour purifiés pour l'extraction d'IgG selon le même procédé décrit. Ces IgG feront l'objet de marquage à la fluorescéine pour le test



avant



après

Fig 5 : Profils électrophorétiques des IgG avant et après précipitation par le sulfate d'ammonium.

d'immunofluorescence indirecte et à la péroxydase pour les tests ELISA.

On a déjà commencé la technique de marquage à la fluorescéine et comme ce sont des techniques auxquelles nous nous initions pour la première fois on a préféré réaliser cette technique sur des IgG de chèvre pour bien maîtriser les détails pratiques de la manipulation avant son application aux IgG anti-chameau. On ne peut pas donner les résultats obtenus puisqu'on les aura seulement dans une semaine, donc après la rédaction de ce rapport.

V - CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A l'issue de ce travail, il s'avère que :

- Le virus cultivé à 40° C est instable et très thermolabile. Il y a inactivation totale du virus dès le troisième passage viral sur cellules.

- L'utilisation de l'électrophorèse sur gel polyacrylamide à 10 % a permis de séparer 7 polypeptides d'un poids moléculaire allant de $2\,10^5$ à 28500 d

électrophorégrammes des autres poxvirus et notamment le virus vaccinal. Pour remédier à ce problème, il faut utiliser des gels de concentration différente en acrylamide et surtout améliorer le rendement en virus produit sur culture cellulaire.

Ces résultats préliminaires doivent être poursuivis et approfondis pour :

- déterminer la localisation des polypeptides sur la particule virale comme il a été fait pour les autres poxvirus ;

- l'identification des protéines virales à caractère antigénique utilisant des techniques plus sensibles : auto-radiographie .... pour la révélation des communautés avec les autres virus du même groupe.

Pour la technique d'immunoblotting, l'utilisation des anticorps monoclonaux permet d'améliorer la sélectivité vis-à-vis des protéines présentes dans le virus concentré.

L'ensemble de ce travail, encore préliminaire, permet de rassembler des connaissances sur le virus de la variole du chameau. Il s'agit du sujet de notre thèse de 3ème cycle de

l'Université de Rabat. Nous ne perdons pas de vue que le but final de notre travail est la mise au point d'un vaccin vivant efficace chez l'animal utilisant les propriétés déterminées en culture pour le virus.

BIBLIOGRAPHIE

1 -BOUCRAUT C.M :Electrophorése en gel polyacrylamide des polypéptides de structure de différentes souches du virus de la myxomatose .Thése pour le doctorat véterinaire .1987 . N°112 Toulouse.

2 -VILAGINES.P et VILAGINES.R :Les poxviridae, caracteres géneraux. Dans virologie médicale. Flammarion Médecine sciences 1985 .p 310-319

2 éme partie

Initiation à la production d'anticorps monoclonaux.

S O M M A I R E

INTRODUCTION

CULTURE D'HYBRIDOME ET PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

I/ Principe

II/ Protocole expérimental

1. Immunisation de souris

2. Fusion cellulaire

a- Matériel
b- Préparation des partenaires de fusion

3. Multiplication des produits de fusion et sélection des hybridomes

4. Tri des clones producteurs d'anticorps spécifiques

III/ Conclusion

PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

TECHNIQUE ET PRODUCTION

INTRODUCTION

Les animaux supérieurs disposent de moyens spécifiques pour combattre les infections virales bactériennes parasitaires et ceci par une réponse immunitaire hautement spécifiqué sous la dépendance des cellules lymphocytaires.

L'inoculation d'un antigène à un animal est suivie de la synthèse d'anticorps : molécules protéiques qui reconnaissent spécifiquement leurs antigènes (Ag) et auxquels elles sont capables de s'unir fortement.

La première rencontre avec l'antigène déclenche un processus de défense lent trés spécifique et durable, la mémorisation de cet évènement permet ensuite une réponse amplifiée si le même antigène se présente encore une seconde fois. Toutes ces fonctions son assumées par les lymphocytes B qui sécrètent des anticorps (Ac) puis aux lymphocytes T qui contrôlent le processus.

L'ensemble des lymphocytes est constitué par une multitude de sous-ensembles cellulaires qui différent par la structure de leurs récepteurs membranaires aux antigènes. Chaque sous-ensemble ou clone est constitué de cellules identiques . Lorsqu'un Ag se présente à l'ensemble des lymphocytes, seules les cellules possédant un récepteur membranaire approprié sont stimulées par leur rencontre avec l'Ag : elles prolifèrent et se différencient. Les lymphocytes B se transforment en plasmocytes sécréteurs d'Ac. Ces anticorps sont en fait une forme légérement modifiée des récepteurs membranaires. Chaque Ac produit par un clone de cellules B est appelé anticorps monoclonal .

Les techniques de production des anticorps monoclonaux (Ac Mc) par la réalisation d'hybridomes en culture cellulaire n'ont pas cessé de progresser et d'évoluer pour mieux améliorer la reproductibilité de la technique depuis sa découverte par KOLHER et MILSTEIN en 1975 jusqu'à nos jours.

Dans ce rapport, nous allons évoquer l'une des méthodes utilisées pour la production d'Ac Mc préconisée par le Laboratoire National de Pathologie Bovine et que nous avons eu l'occasion de voir et de pratiquer durant notre stage au service de virologie de ce laboratoire .De même nous allons signaler brièvement certaines autres manipulations auxquelles nous avons participé .

CULTURE D'HYBRIDOMES ET PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

I/ Principe

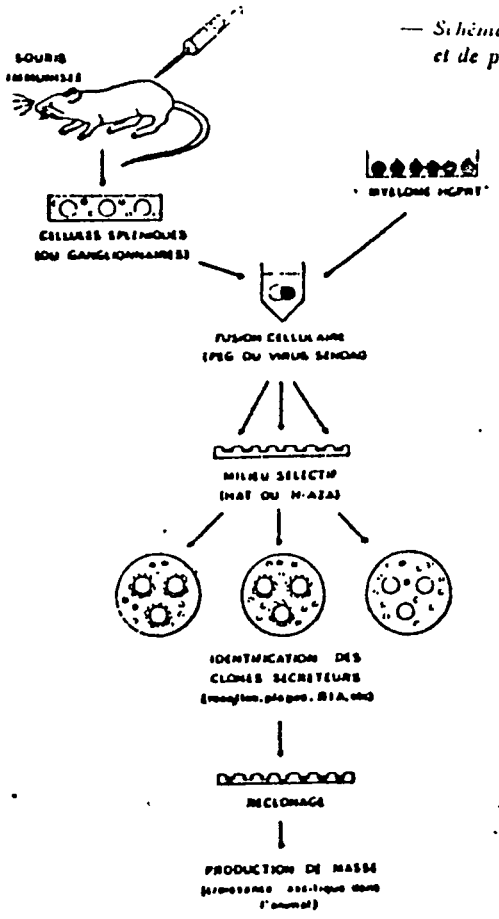
Les anticorps monoclonaux sont sécrétés par des hybridomes provenant de la fusion avec un plasmocyte producteur d'un Ac dirigé contre un antigène choisi, avec plasmocyte tumoral .

Le génome du lymphocyte qui ne se multiplie pas en conditions de culture cellulaire apporte à l'hybride l'information nécessaire à la synthèse du type d'immunoglobuline déclenchée à la suite de l'immunisation par l'Ag choiosi. Le myélome qui se multiplie en culture cellulaire apporte la capacité de division indéfinie à l'hybride. Les lignées myélomateuses les plus couramment utiliséees sont d'origine murine et dérivent de plasmocytomes isolés de souris consanguines BALB/C.

Les cultures hybrides productrices d' Ac mises en évidence par des techniques radioimmunologiques ou par immunofluorescence sont retenues et subissent un clonage. Les meilleurs clones producteurs de l'Ac sont cultivés à grande échelle et injectés dans le péritoine de souris qui développe une tumeur ascitique contenant en grande quantité des anticorps monoclonaux .

II/ Protocole expérimental

Les procédures suivies par différents laboratoires pour la production d' Ac Mc suivent pour l' essentiel le protocole décrit initialement par KOHLER et MILSTEIN.



— *Schéma du protocole général d'isolement d'hybridomes et de production d'anticorps monoclonaux.*

D'aprés G. Buttin et P.A Cazenave

1. <u>Immunisation des souris</u>

Les souris mises en oeuvre pour la production d'Ac Mc sont des souris BALB/C provenant d'un élevage sain, homogéne et protegé contre toute source de contamination. L'immunisation de ces souris se fait par des injections de l'Ag choisi à des intervalles de temps bien déterminés.

- Premiére injection :Elle se fait par voie intrapéritonéale (I/P) avec un mélange à volume égal de virus de culture et d'adjuvant complet de freund à raison de 1 ml/souris .

- Deuxiéme injection : quinze jours plus tard, on renouvelle une injection par la même voie avec un mélange: virus de culture + adjuvant incomplet de freund .

Ces deux injections permettent d'activer et de stimuler les lymphocytes B parentaux .

- Troisiéme injection : quinze jours aprés le premier rappel en I/P, toujours mais avec du virus pur, 1ml/souris .

- Derniére injection : dix jours aprés la troisiéme injection et deux jours avant la fusion . Elle est réalisée de la même maniére que les autres injections avec du virus pur .

Les deux derniéres injections par le virus pur permettent aux lymphocytes B dejà stimulés et activés de passer au stade blastique (cellules grosses avec un large noyau et possédant la capacité de se diviser) ; ces cellules sécrètent de faibles quantités d'Ac .

Le calendrier d'immunisation, les quantités d'Ag utilisées pour les injections, le titre du virus ainsi que l'association à un adjuvant de l'immunité sont des facteurs à optimiser car ils peuvent influencer la reproductibilité de la production d' Ac Mc.

2. Fusion cellulaire

a- Matériel

* Milieux :

- milieu RPMI 1x concentré,
- sérum de veau foetal,
- antibiotiques (bipénicilline + polymixine + fongizone),
- solution de pyruvate,
-PEG 4000.

* Appareillage + matériel plastique

- centrifugeuse avec contrôle de température,
- étuve à CO à 37°C humidifiée,
- bain marie à 37°C,
- boîte de chirurgie stérile,
- pipettes stériles,
- plaques de 24 puits,
- falcons pour culture cellulaire,
- seringues en plastique stériles,
- pots de centrifugation,
- gaze stérile.

b- Préparation des partenaires de fusion

* Cellules myélomateuses

Les cellules myélomateuses qu'on a utilisé sont des cellules SP2 HGPRT - déficientes en enzyme hypoxantine guanine phosphoribosyltransférase. Ces cellules doivent être en excellent état de viabilité (90 à 100% de cellules vivantes) au moment de la fusion et récoltées à une phase de croissance exponentielle ; pour celà, il faut les dédoubler la veille en utilisant du milieu RPMI supplémenté avec 1% d'antibiotiques, 1% de pyruvate et 20% de sérum de veau foetal (SVF). Elles sont cultivées dans des falcons 75 cm2 de surface et sont incubées en position verticale dans une étuve à CO2 en atmosphére humide .

Au moment de la fusion, les cellules sont centrifugées 2 fois pendant 10 minutes à 1200 tours/min.La deuxième centrifugation qui se fait avec du milieu RPMI sans sérum permet d'éliminer les traces de sérum du milieu de culture .

• Cellules lymphocytaires

En général toutes les cellules lymphocytaires peuvent fusionner mais pas avec la même efficience ou du moins avec la même capacité à survivre aprés la fusion . Beaucoup d'arguments indiquent que les cellules les plus intéressantes pour la production d'hybrides sont celles qui sont aptes à se diviser et sécréter des Ac . Les seules cellules qui répondent à cette condition sont des lymphocytes B activés par le signal antigénique, déjà porteurs d'immunoglobulines membranaires dirigées contre l'antigène, encore localisés dans les organes lymphoïdes mais sur la voie de différenciation en plasmocytes (3).

A la fin de l'immunisation, 48 heures aprés le dernier rappel, la rate orgagne riche en lymphocytes (10 cellules) est prélevé stérilement aprés splénectomie de la souris tuée par dislocation cervicale (on évite l'utilisation d'anesthésiques, éther ou chloroforme, qui peuvent passer dans le sang et dans le milieu splénique). La rate est ensuite coupée en menus morceaux puis dilacérée dans du milieu RPMI sans sérum . La suspension cellulaire obtenue est filtrée à travers une gaze stérile (pour la débarrasser des gros débris fibroblastiques) sur le culot de cellules SP2 dejà recueilli. L'ensemble est lavé par deux centrifugations successives à 1200 trs/min pendant 10 minutes à température ambiante .

Les deux populations de cellules mélangées dans un rapport de 10 splénocytes pour une cellule myélomateuse sont mises à fusionner par un agent chimique : • le PEG 4000 dejà stérilisé par autoclavage et tiédi à 37°C . La solution du PEG (1,2 ml) est

ajoutée sur le culot cellulaire goutte à goutte pendant une minute avec agitation dans un bain marie à 37°C puis aprés on additionne 10 ml du milieu RPMI sans sérum délicatement pour faire diluer le PEG . L'ensemble est placé à 37°C pendant une heure pour permettre aux fusions dejà initiées de s'achever. Ce délai passé, les cellules sont mises en culture dans du milieu RPMI à 20% SVF et réparties dans des plaques 24 puits puis incubées à 37°C dans une étuve à CO2. Avec le produit cellulaire d'une fusion, on peut faire 4 plaques .

Au cours de l'hybridation cellulaire induite par l'action du PEG, les membranes cellulaires fusionnent, donnant naissance à des cellules plurinucléees ; pour certaines les noyaux vont également fusionner pour donner des cellules hybrides mononucléees appelées hybridomes capables de se diviser perpétuellement grâce à l'information génétique des cellules myélomateuses et de sécréter les Ac spécifiques dirigés contre l'Ag choisi grâce à l'information portée par les lymphocytes B immunisées.

3. Multiplication des produits de fusion et sélection des hybridomes

Aprés la fusion, les cellules hybrides en culture, minoritaires dans la population, doivent seules proliférer ; cependant l'existence de cellules myélomateuses non fusionnées peuvent submerger rapidement la culture . Pour ce fait une sélection postfusionelle est nécessaire pour permettre aux seules cellules hybrides de se multiplier . Cette condition est satisfaite par l'addition d'un milieu sélectif couplé avec l'introduction dans la lignée myélomateuse d'un marqueur

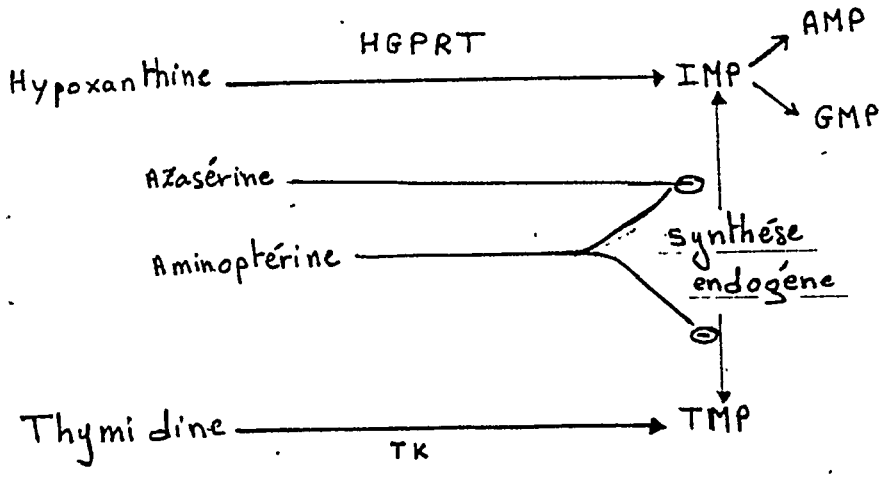
génétique . Le marqueur génétique utilisé est la déficience en l'enzyme de métabolisme purique : hypoxantine guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT) dont l'activité nécessite la présence de l'hypoxantine exogéne comme source de nucléotides puriques . Il y a une autre voie de biosynthèse : voie endogéne qui assure la production de bases puriques (Adénine-guanine) à partir de molécules simples , quand le milieu ne contient pas d'hypoxantine (3) .

Les cellules (HGPRT) sont sélectionnées par leur résistance à des analogues de substrat toxiques de l'enzyme et qui sont : 8-azaguanine ou 6-thioguanine. La contre-sélection de ces cellules est réalisée par l'incorporation au milieu de culture de l'aminoptérine inhibiteur des voies de biosynthése endogéne des purines.

L'aminoptérine inhibant simultanément la biosynthèse de la desoxythymidilate (TMP), son utilisation impose l'addition de la thymine dans le milieu .

En résumé, le milieu sélectif utilisé consiste en un milieu RPMI à 20% SVF additionné de l'hypoxantine (1%), aminoptérine (1%) et thymidine (1%) = milieu HAT .

Dans ces conditions, seuls se multiplient les clones hybrides chez lesquels la juxtaposition des deux génomes parentaux réalise la complémentation génétique .



Donc le lendemain de la fusion, un changement de milieu avec du RPMI HAT s'avére nécessaire . La moitié du milieu initial de chaque cupule est aspirée puis remplacée par du milieu HAT , les cellules sont ensuite mises en incubation pendant 6 jours pour effectuer un deuxième changement de milieu mais cette fois-ci avec du milieu HT uniquement pour éliminer les substances toxiques libérées par les cellules mortes qui n'ont pas pu se diviser et pour permettre aux clones d'hybridomes de se maintenir dans des conditions adéquates .

4. Tri des clones producteurs d'anticorps spécifiques

Les clones sont suivis par observation microscopique à partir du 10ème jour qui suit la fusion pour détecter leur état et s'assurer de leur viabilité . Les clones vivants apparaissent brillants, ronds et homogénes du point de vue de la taille (photo 1). L'examen microscopique permet aussi de choisir un stade de développement suffisant pour assurer une sécrétion d'Ac détectable dans le surnageant de culture (photo 2).

Les techniques de détection des Ac dans le surnageant de culture d'hybridomes sont nombreuses (ELISA, tests radio-immunologiques, immunofluorescence ...) ; seulement il faut choisir un test commode à pratiquer, rapide et sensible. La technique choisie par le LNPB est l'immunofluorescence indirecte.

Les clones producteurs d'Ac révélés par ce test sont prélevés et multipliés dans des falcons de 75 cm2 de surface pour leur amplification, sans oublier toutefois de marquer le numéro de la cupule et de la fusion sur les nouvelles boîtes de culture pour pouvoir se repérer dans les clonages ultérieurs.

Exemple : BVD.II.8 ← N° de la cupule

Virus choisi

N° de la plaque

Les clones qui ont pu conserver leur capacité de sécréter des Ac pendant plusieurs semaines seront soumis à un clonage proprement dit. Celui-ci consiste à faire séparer physiquement les cellules les unes des autres. La suspension cellulaire de clones sécréteurs est diluée jusqu'a 10^{-5} ou 10^{-6}, 1 ml de chacune de ces derniéres dilutions est repris dans 100 ml du milieu RPMI HT à 20% SVF puis répartis dans une plaque 24 cupules. On suppose que chaque cupule contient une cellule qui peut alors proliférer et donner naissance à un clone cellulaire . Ces clones sont à leur tour testés par IF indirecte pour s'assurer de leur spécificité, comme ils peuvent être reclonés afin de garantir leur pureté génétique. Ces clones sont alors soit multipliés in vitro soit inoculés à des souris histocompatibles par voie I/P

chez lesquelles ils développent des tumeurs ascitiques dont le fluide contient plusieurs milligrammes /ml d'Ac Mc exprimant la spécificité choisie. Le liquide ascitique est récupéré par ponction à l'aide d'une aiguille de seringue puis centrifugé ,le surnageant est récolté puis purifié avant stockage.

Pour les clones multipliés in vitro, il faut vérifier leur stabilité génétique par des sous-clonages, parce que la culture d'un clone sur une longue période l'expose à de nouvelles dérives génétiques . Les hybridomes murins comme toute cellule polyploïde, perdent fréquemment une partie de leur matériel chromosomique(2).Seuls sont gardés les sous-clones qui ont pu conserver sur plusieurs semaines leur aptitude à produire des Ac. Ils seront congelés dans l'azote liquide en présence d'un agent protecteur : le diméthylsulfoxyde(DMSO).

Le suivi des cultures cellulaires depuis la fusion jusqu'à la congélation des clones intéressants doit être conduite avec une grande considération car l'efficacité et surtout la reproductibilité de ces procédures dépendent de menus détails pratiques qui doivent être réalisés avec beaucoup de précision.

Durant notre stage au service de virologie au LNPB, on a pu réaliser quatre fusions cellulaires pour des virus différents (Parapoxvirus, entérovirus ,parvovirus, BVD) pratiquées suivant le même protocole décrit dans ce rapport. Seulement en une période de dix jours, il nous a été impossible de suivre les étapes ultérieures pour ces fusions, mais on a pu réaliser ces

étapes (détection des clones sécréteurs, multiplication des clones, récolte de l'ascite ...) pour d'autres fusions qui ont été déjà établies par le Dr. Moussa et dont l'une de ces fusions a donné des clones producteurs d'anticorps monoclonaux dirigés contre le virus HB4 (Herpes bovin type 4).

Parallèlement à l'étude des Ac Mc, on a pu participer à d'autres activités du service comme :

- L'étude de l'ADN viral par isolement et restriction enzymatique pour l'établissement de cartographies donc pour l'analyse des séquences nucléotidiques ; cette technique trouve son application dans l'étude épidémiologique.

- Diagnostic direct du virus, soit :

* par microscopie électronique en étudiant la taille, la morphologie et la structure des virus après coloration négative par le silicophosphotungstate, quand il s'agit de prélèvement direct, ou par fixation à la glutaraldéhyde, inclusion dans une résine, coupe et coloration par l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb pour les virus en culture cellulaire.

* par immunofluorescence indirecte, technique permettant un diagnostic rapide, spécifique et sensible. On visualise l'emplacement de l'antigène par fluorescence cytoplasmique, nucléaire ou membranaire.

L'utilisation des Ac Mc par IF indirecte appliquée aux maladies virales permet d'améliorer la sélectivité et la

sensibilité pour l'identification de l'agent causal (principe de la technique en annexe 1).

III/ Conclusion

Les apports des Ac Mc au diagnostic des infections virales sont très importants aussi bien pour la détection du virus dans les produits pathologiques que pous la recherche et le titrage des Ac élaborés contre eux.

- Grâce à la spécificité des Ac Mc, un diagnostic rapide sur les prélèvements directs peut être effectué et permet de décider du type de traitement à envisager.

- Ils peuvent aussi servir d'outils de purification lorsqu'ils sont couplés à des supports solides pour des chromatographies d'affinité.

- L'imagerie immunoenzymatique et radioimmunologique est une autre application des Ac Mc.

- Ils permettent d'expliquer la pathogénicité et certaines épidémiologies virales par la révélation de modifications minimes de structure des antigènes.

En récapitulation, les Ac Mc représentent des sondes standardisées et universelles pour le diagnostic biologique et on tend actuellement à élargir leur domaine d'application pour leur

utilisation dans le domaine thérapeutique (sérothérapie ...). Ils jouent un rôle dans la préparation de vaccins, qu'ils soient constitués de virus vivant ou inactivé. Ils permettent la purification de virions ou de sous-unités virales par passage sur colonne d'immunoaffinité. Cette technique est maintenant couramment employée à l'échelle industrielle.

BIBLIOGRAPHIE

1 - BUTTIN G. et CAZENAVE P.A. : L'hybridation des cellules lymphocytaires. Bull. Inst. Pasteur, 1980, 78 : 7-47.

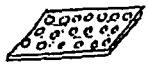
2 - GROSCLAUDE J. : Culture d'hybridomes. Publication personnelle.

3 - LOVBORG U. : Monoclonal antibodies : production and maintenance. William Heineman Medical Books, London 1982.

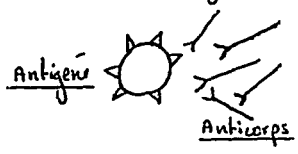
A N N E X E S

Principe de l'immunofluorescence indirecte

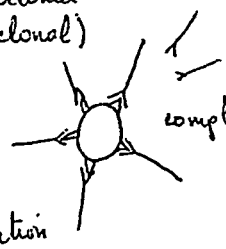
cultures cellulaires infectées
par le virus choisi et fixées
par l'acétone dilué dans l'eau (15%)



on met l'anticorps correspondant (soit monoclonal soit polyclonal)
dirigé contre l'antigène

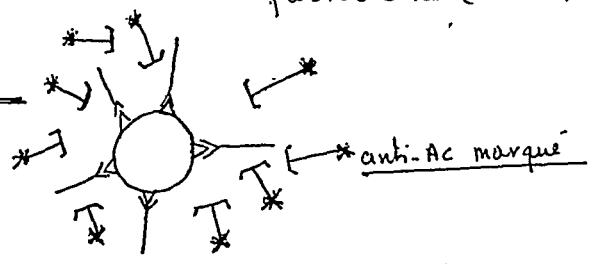


on laisse en contact 1 heure à 37°c pour permettre la complexation



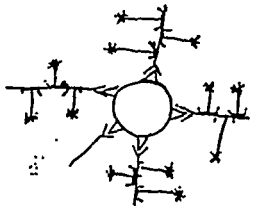
3 lavages successives pour éliminer les Ac non complexés

on fait agir l'anti-Ac marqué à l'isothiocyanate de fluoresceïne (FITC)



on laisse 30 min à 37°c en contact

lavage 3 fois



complexe Ag/Ac/anti-Ac

ecture au
oscope à
rescence.

- La fluoresceïne lorsqu'elle est excitée par les U.V émet une lumière visible de couleur jaune-vert qui indique l'emplacement de l'antigène dans la cellule.

Aspect des cellules hybrides au microscope photonique.

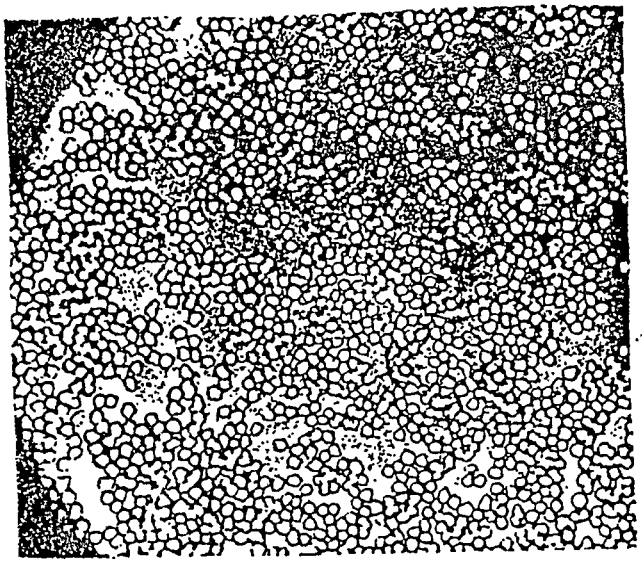


photo n° 1 : Concentration cellulaire optimale

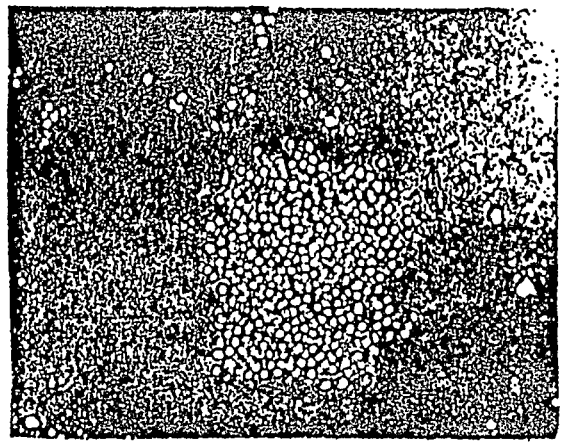


photo n° 2 : hybridomes quelques jours après la fusion.
stade où la détection d'Ac dans le surnageant est possible.

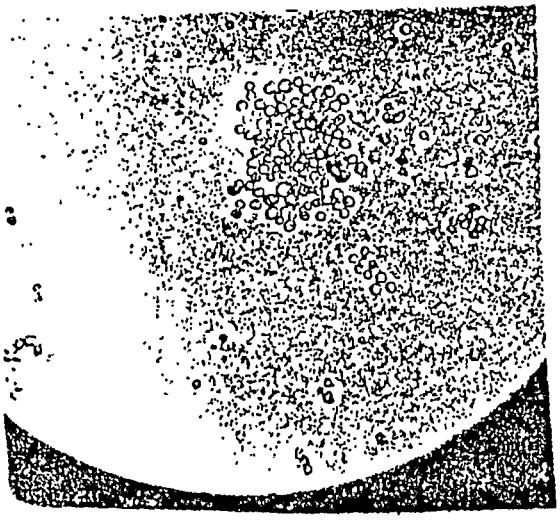
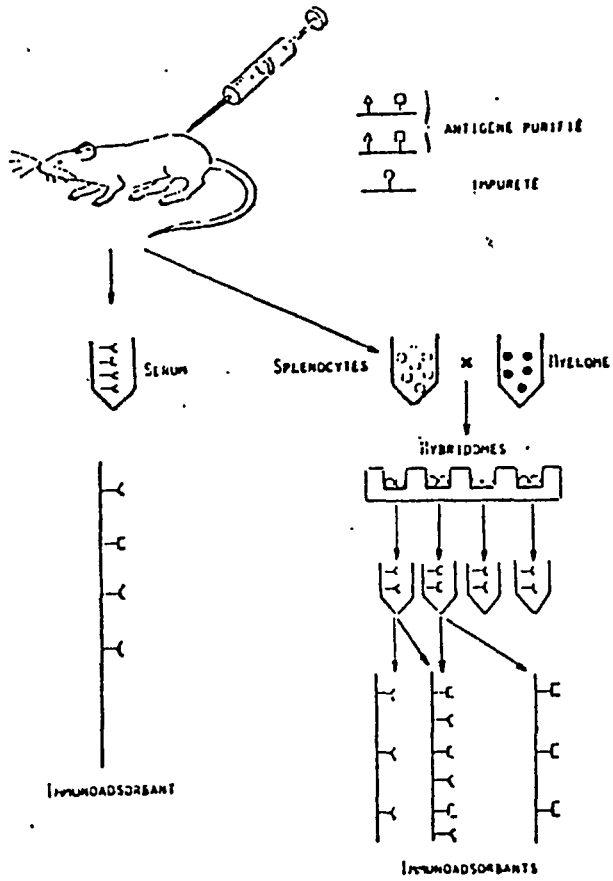


Photo n° 3 : quelques jours après la prise de la photo 4.

photo n° 4 : cellules après clonage par la dilution limite.

Photos prises de : Monoclonal antibodies : Production and maintenance.
L Øvborg Iiff.
William Heinemann Medical Books 1982

Utilisation des anticorps monoclonaux pour la purification d'un constituant biologique par chromatographie d'affinité sur immunoadsorbant



D'après G. Buttin et P. A Cazenave
L'hybridation des cellules lymphocytaires
Bulletin de l'Institut Pasteur 1980