

Abréviations

VFVR : Virus de la fièvre de vallée du Rift

FVR : Fièvre de la vallée du Rift

Ag : Antigène

Ac : Anticorps

AcM : Anticorps monoclonaux

Ig : Immunoglobuline

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

EDTA : Acide Ethyléne Diamine Tétra-acétique

PFU : Plage Formant Unité

PBS : Phosphate Buffer Saline

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ip : intra péritonéale

iv : intra veineuse

HGPRT : Hypoxantine-guanine-phosphoribosyl transférase

PEG : Polyéthyléne glycol

TMB : 3, 3', 5, 5'-Tétraméthyl-Benzidine

DMSO : Diméthyle Sulfoxyde

OPI : Oxaloacétate-Pyruvate de sodium-Insuline bovine

DO : Densité optique

IFI : Immunofluorescence indirecte

mn : minute

mg : milligramme

ml : millilitre

µg : microgramme

µl : microlitre

Kda : kilodalton

trs/mn : tours par minute

SNN : souriceaux nouveau-nés

PCR : polymerase chain reaction

Sommaire

Introduction1

Première partie : Généralités sur les AcM et le VFVR

Chapitre I : Production des AcM.....	2
1 - Définition des AcM.....	2
2 - Historique.....	2
3 - Méthodologie de la production.....	3
3.1 - Immunisation.....	3
3.1.1 - Choix de l'immunogéne.....	3
3.1.2 - Pureté et forme de l'immunogéne.....	3
3.1.3 - Choix de l'espèce animale.....	4
3.1.4 - L'influence des adjuvants sur la réponse immunitaire.....	5
3.1.5 - Protocoles d'immunisation.....	6
3.1.6 - Organes cibles et voies d'inoculation.....	7
3.2 - Fusion.....	8
3.3 - Clonage.....	11
Chapitre II : Le virus de la FVR.....	13
1 - Définition de l'agent pathogène.....	13
2 - Epidémiologie-Transmission et Clinique- Traitement et Prévention.....	13
2.1 – Epidémiologie.....	13
2.2 - Transmission et Clinique.....	14
2.3 - Traitement et Prévention.....	15
3 - Diagnostic de laboratoire.....	16
3.1 - Les méthodes virologiques.....	16
3.2 - Les méthodes sérologiques.....	17
3.3 - La méthode histopathologique.....	18
3.4 - Les méthodes génétiques.....	18
4 - Cibles antigéniques de la réponse immunitaire.....	19

Deuxième partie : **Travaux personnels**

Chapitre I : Objectifs	21
Chapitre II : Matériel et Méthodes	21
1 – Matériel	21
1.1 - Matériel biologique	21
1.2 - Matériel technique de laboratoire	22
1.3 - Tampons et réactifs	24
2 – Méthodes	28
2.1 - Préparation des Ag	28
2.1.1 - A partir de cultures cellulaires	28
2.1.1.1 - Culture de cellules VERO	28
2.1.1.2 - Infection des cellules VERO	29
2.1.2 - A partir de cerveaux de SNN	30
2.2 - Préparation des ascites polyclonaux	31
2.3 – Immunisation	32
2.4 – Fusion	32
2.4.1 - Avant la fusion	32
2.4.2 - Le jour de la fusion	33
2.4.2.1 - Préparation des cellules de myélome X63	33
2.4.2.2 - Préparation des cellules spléniques	34
2.4.2.3 - Calcul du mélange de fusion	35
2.4.2.4 - Fusion	35
2.4.2.5 - Calcul du nombre de plaques de 24 puits à utiliser	36
2.4.2.6 - Changement du milieu de fusion	36
2.5 - Sélection des hybridomes	37
2.6 - Clonage	39
Chapitre III : Résultats	41
1 - Titrage Ag de cerveau	41
2 - Titrage ascites polyclonaux	44
3 - Immunisation	44
4 - Fusion et clonage avec la souche MP12	48
5 - Fusion et clonage avec la souche CL13	51
Chapitre IV : Discussion	54

Conclusion.....	57
-----------------	----

Introduction

Les infections par des virus responsables de fièvres hémorragiques sont une cause importante de maladies chez l'homme et posent un problème de santé publique à l'échelle mondiale. Ces virus sont actuellement les plus craints des virus de la faune sauvage transmissible à l'homme et parmi eux figure le virus de la fièvre de la vallée du Rift (VFVR).

Cette anthropozoonose découverte depuis 1931 au Kenya (10) s'est répandue dans le continent africain et même au-delà de ses frontières. Ces dernières années, elle s'est manifestée au Mali, en Mauritanie et au Sénégal causant de nombreuses pertes humaines et animales (16).

Les organismes internationaux tels que l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) s'efforcent de mettre au point des méthodes permettant de déceler plus rapidement les flambées et d'éviter la propagation de telles infections.

Pour l'étude de la plupart de ces agents pathogènes, il n'existe pas de réactifs commercialisés, et les réactifs qui existent ne sont pas produits en quantité suffisante.

Les anticorps ont pendant longtemps joué un rôle essentiel dans le diagnostic de certaines maladies, mais leur efficacité a toujours été limitée par leur nature polyclonale. La solution des problèmes posés par l'hétérogénéité des anticorps a été apportée par la mise au point de la technologie de production d'anticorps monoclonaux (AcM) par Milstein et Köhler en 1975 (32).

Ces AcM trouvent de nombreuses applications dans le domaine de la recherche, de la thérapeutique et du diagnostic de certaines affections.

C'est dans cette perspective que nous nous sommes investis à la production d'AcM murins dirigés contre le VFVR comme réactifs permettant d'améliorer le diagnostic.

Chapitre I : Production des anticorps monoclonaux

1-Définition

Les anticorps sont des protéines plasmatiques (immunoglobulines) fabriquées par l'organisme en réaction à l'injection de substances étrangères. Ils participent au rejet de ces substances en se combinant spécifiquement avec elles. Bien que spécifiques, les anticorps sécrétés en réponse à un antigène donné présentent une grande diversité : ils proviennent de lymphocytes différents et sont appelés anticorps polyclonaux. En revanche par clonage cellulaire, on peut obtenir des lignées cellulaires produisant des anticorps monoclonaux, tous identiques c'est à dire de même classe et sous-classe, de même spécificité, de même affinité, dirigés contre les différentes parties de l'antigène injecté (2, 13).

2-Historique

La méthode de fusion cellulaire a été mise au point par G.Barski en France en 1960, mais la technologie de production des anticorps monoclonaux (AcM) de souris est née en 1975 grâce à Köhler et Milstein apportant ainsi la solution aux problèmes posés par l'hétérogénéité des anticorps dans les immuns sérums traditionnels. Ils ont montré que des cellules de splénocytomes murins peuvent être fusionnées avec des cellules spléniques de souris immunisées contre un antigène donné. Ces hybridomes produisent alors des AcM d'une spécificité prédéterminée (25).

3-Méthodologie de la production des anticorps monoclonaux (AcM)

3.1-Immunisation

3.1.1-Choix de l'immunogène

Généralement plus un antigène est de grande taille plus sa structure est complexe, et plus grande est la distance phylogénétique entre l'animal donneur de l'antigène et l'animal à immuniser, meilleure sera la réponse immunitaire induite (48).

3.1.2- Pureté et forme de l'immunogène

La pureté de l'antigène à utiliser comme immunogène n'est pas décisive pour générer des anticorps monoclonaux contrairement aux anticorps conventionnels.

Parmi les antigènes naturels, les cellules entières constituent de bons immunogènes et induisent une bonne réponse immunitaire sans l'utilisation d'adjuvants. L'immunisation de souris pour la production AcM requiert l'injection d'un certain nombre de cellules entre $2 \cdot 10^6$ et $5 \cdot 10^7$ cellules (24). Selon Spitz et ses collaborateurs, moins de 20µg de protéines antigéniques ou $2,5 \cdot 10^5$ cellules suffisent pour immuniser les souris (56).

Les molécules de poids moléculaire inférieur à 10 000 Da sont généralement faiblement immunogènes. Les aminoacides, les monosaccharides, les glycoprotéines, les glycolipides etc ne peuvent induire elles même une réponse immunitaire : ce sont des haptènes. Des anticorps antihaptènes ne pourront être générés qu'en immunisant avec l'haptène conjuguée à une molécule porteuse immunogène telle que la BSA (Bovine sera albumine).

Des cellules entières peuvent aussi être utilisées comme molécules porteuses, Ahlstedt et Bjorksten l'ont montré en utilisant une lignée murine de cellules tumorales P 388 AD. 2 (1).

Des antigènes faiblement immunogènes peuvent être rendus immunogènes par adsorption sur des particules inertes telles que l'hydroxyde d'aluminium, la bentonite etc ou par agrégation et ainsi l'antigène pourra être injecté sous sa forme agrégée (24).

A coté de ces antigènes naturels, il existe des antigènes dits modifiés ou synthétiques qui regroupent les antigènes ou haptènes qui physiologiquement ne sont pas immunogènes mais le deviennent lorsqu'ils sont couplés à des molécules porteuses. Parmi les antigènes synthétiques les oligopeptides ont récemment été les premiers à donner des résultats satisfaisants dans la production d'anticorps (43, 2, 54, 45).

3.1.3-Choix de l'espèce animale

Le choix de l'espèce et de la souche de l'animal à utiliser comme donneur de rate immune pour la fusion dépend largement des cellules de myélomes disponibles et de l'origine de l'antigène d'immunisation. Les souris sont les plus couramment utilisées pour l'immunisation surtout parce qu'il y a plus de cellules de myélomes murins disponibles. De plus les souris sont plus faciles à élever et à manipuler et en général elles répondent mieux que les rats.

Les souris de souche de Balb /c sont utilisées de préférence et depuis tous les myélomes murins utilisables pour des fusions ont été dérivés de cette souche.

Pour des raisons encore peu précises, l'efficacité des hybridomes rat x rat est plus faible que celle des hybridomes souris x souris dans la plupart des laboratoires. Cependant, certains chercheurs ont fusionné des splénocytes de rats et des cellules de myélome de souris et ont obtenu des hybridomes qui secrètent des AcM de façon stable dans des cultures de tissus (17).

IL faut utiliser des animaux en bonne santé, non stressés, âgés de 8 à 12 semaines. Des souris âgées de 8 semaines donnent en même temps des IgG totaux et l'anticorps spécifique.

Le sexe des souris ne semble pas avoir un impact significatif sur la réponse immunitaire (28, 29).

3.1.4-L'influence des adjuvants sur la réponse immunitaire

Les adjuvants permettent d'augmenter la réponse immunitaire, de diminuer la dose d'antigène requise et de réduire le nombre d'injections.

Ils agissent par différents mécanismes : ils activent les macrophages, attirent les lymphocytes vers l'antigène ou améliorent la présentation de l'antigène et la formation du dépôt. Ils agissent en différant la libération de l'antigène du dépôt formé à l'injection en modifiant la phagocytose des antigènes et en modulant la fonction des cellules immunes aux moyens de composants bactériens (Mycobacterium, Bordetella pertussis...)

La plupart des adjuvants comme le Lipopolysaccharide (LPS), l'adjuvant complet de Freund (ACF), stimule de façon non spécifique la production d'immunoglobulines et provoque une stimulation polyclonale du système immunitaire ce qui n'est pas le cas lorsque l'antigène est utilisé seul (23).

Beaucoup d'adjuvants agissent à la surface des cellules parce qu'ils renferment des composants hydrophiles et lipophiles et parmi eux : les saponines, les liposomes, lysolecithines, les polyalcools, les amines lipophiles, les glycolipides...

A côté de ce groupe il existe une autre classe d'adjuvants avec des propriétés physico-chimiques différentes, ce sont des polymères anioniques tels que les polynucléaires, le dextran sulfate... Aucune de ces substances n'est indiquée comme étant celle qui convient spécialement à la production des AcM.

Prises individuellement elles sont de loin moins bonnes que les adjuvants classiques que sont l'adjuvant complet / incomplet de Freund et l'hydroxyde d'aluminium. L'adjuvant incomplet de Freund est constitué d'une simple émulsion eau dans huile. Si l'on inclut dans la phase huileuse *Mycobacterium tuberculosis* inactivé par la chaleur, on parle d'adjuvant complet de Freund. Ce dernier n'est généralement requis que pour la première innoculation, pour les suivantes on utilise l'adjuvant incomplet (48).

Il existe d'autres adjuvants issus de synthèses chimiques ou extraits de plantes, de bactéries tels que le lipopolysaccharide (LPS) préparé à partir de bactéries gram négatif comme *Escherichia coli*, *Salmonella* ou d'autres enterobactéries (4).

3.1.5-Protocoles d'immunisation

Selon Rathjen et ses collaborateurs il y a 6 règles d'or pour l'immunisation

1-Utiliser des animaux en bonne santé, non stressés, âgés de 8 à 12 semaines

2-Immuniser plusieurs animaux

3-Utiliser le peu d'antigène possible

4-Maximiser l'immunogénicité en évitant la tolérance. Faciliter l'accès de l'antigène aux cellules cibles par des injections intraveineuses ou intra péritonéales ou par des injections intramusculaires ou sous cutanés à des points différents

5-Etre patient : attendre que le titre anticorps de la 1^{ère} innoculation baisse à nouveau (ceci permet de diminuer la proportion d'antigène perdue par liaison avec le sérum anticorps)

6-L'adjuvant complet/incomplet de Freund est le meilleur (50).

Il Existe plusieurs protocoles d'immunisation résumés dans le tableau I.

Tableau I : Différents types de protocoles d'immunisation (48)

Schéma long (jours)	Schéma court (jours)	Injection	Dose ($\mu\text{g}/\text{souris}$)	CFA (μl)	IFA (μl)	PBS (μl)
1	1	Priming	100	100	-	100
30	14	Boost(i.p)	50	-	100	100
60	21	Boost(i.p)	50	-	100	100
90		Boost(i.p)	50	-	100	100
120	28	Boost(i.v)	50	-	-	200
121	29	Boost(i.v)	50	-	-	200
122	30	Boost(i.v)	50	-	-	200
123	31	fusion				

3.1.6-Organes cibles et voies d'inoculation

La cavité péritonéale se trouve être l'endroit idéal pour la 1^{ère} immunisation. Les injections sous cutanées stimulent les lymphocytes des noeuds lymphatiques périphériques plutôt que ceux de la rate. L'utilisation d'adjuvant de Freund en injection dans les pattes peut provoquer une inflammation et un renflement ce qui est atroce pour les animaux.

Les injections intradermiques ou intramusculaires peuvent entraîner des ulcérations mortelles. Les injections intraveineuses qui sont difficilement réalisables et pouvant occasionner un choc anaphylactique mortel sont toutefois pratiquées exceptionnellement lors du boost précédent la fusion.

L'injection directe d'antigènes solubles ou liés dans la rate permet de réduire les doses d'immunogènes à utiliser (48).

En principe les souris peuvent aussi être immunisées par des injections dans les noeuds lymphatiques de l'abdomen et le volume à appliquer n'excède pas 1 μl mais la concentration en antigène sera relativement élevée (51).

3.2- Fusion

Les souris hyper immunes doivent subir un boost au 3^{ème} et 4^{ème} jour avant la fusion par des injections intra péritonéale et /ou intraveineuse (17).

Il existe plusieurs lignées cellulaires de myélome de souris disponibles pour la fusion (voir tableau II)

Tableau II : Lignées cellulaires de myélome de souris

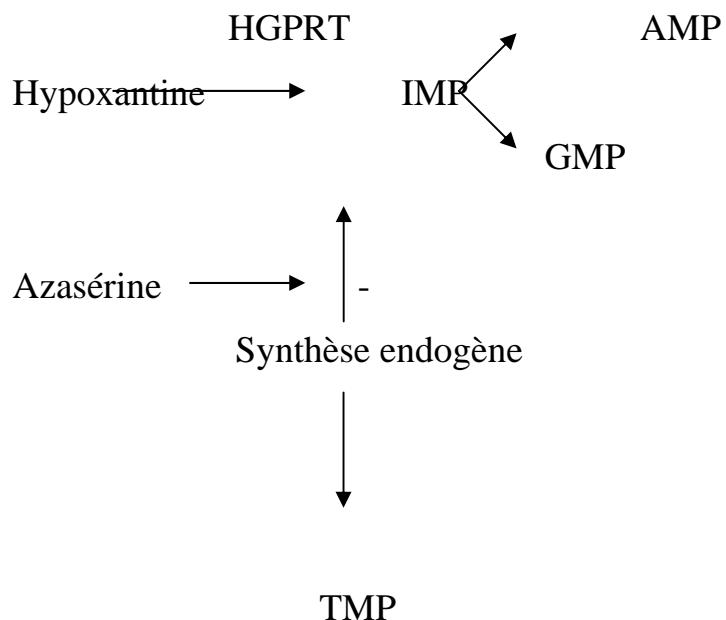
Lignée cellulaire	Classe d'Ig	Origine	Référence
X63-Ag8	IgG1, k	MOPC-21	33
NS1-Ag4/1	K, intracellulaire	X63	34
X63-Ag8.653	Aucun	X63Ag8	31
Sp2/0-Ag14	Aucun	X63-Ag8xBalb/c	55
NSO/1	Aucun	NS1-Ag4/1	22
FO	Aucun	Clone of SP2/O	19
S19/5XXO B4.1	Aucun	S.194	61
MPC11- 45.GTG1.7	IgG2b	MPC-11	38
FOX.NY	Aucun	NS1	57

Le principe de la production d'hybridomes repose sur la fusion des lymphocytes B (LB) sécrétant des anticorps mais qui ne se multiplient pas *in vitro* avec des cellules de myélome qui ont la capacité de se multiplier à l'infini *in vitro* dans un milieu de culture (32).

L'hybridome hérite ainsi de la cellule cancéreuse la propriété de se multiplier indéfiniment et du LB celle de sécréter un Ac spécifique à l'Ag d'immunisation. L'agent de fusion est le polyéthylène glycol (PEG). Cette substance fragilise la membrane plasmique et altère les structures lipidiques membranaires pour faciliter la fusion entre les cellules. La sélection des hybrides se fait dans un

milieu de culture particulier, dans ce milieu les LB ne se multiplient pas car ils ne vivent pas en culture *in vitro*. En outre, les cellules de myélome ne s'y multiplient pas car elles ont été préalablement sélectionnées dans un milieu contenant de l'Azaguanine, pour l'expression d'un déficit en une enzyme : l'hypoxantine-guanine – phosphoribosyl transférase (HGPRT). En effet cette enzyme, intervient dans la synthèse exogène des bases puriques, il suffit alors de bloquer la voie endogène de cette synthèse en ajoutant un inhibiteur l'azasérine dans le milieu de culture.

Toutefois ce milieu dit sélectif doit aussi contenir de l'hyopoxantine qui permet aux cellules hybrides d'effectuer la synthèse exogène de nucléotides puriques et pyrimidiques. Finalement, seuls les hybridomes survivent dans ce milieu, puisqu'elles ont l'enzyme HGPRT apportée par leur parent lymphocyte, en plus de la capacité de prolifération illimitée du parent myélome (48).



IMP=Inosine monophosphate

AMP=Adénosine-monophosphate

GMP=Guanosine-monophosphate

TMP=Desoxythymidilate

figure 1 : Principe de la sélection des hybridomes reposant sur la réacquisition d'une HGPRT fonctionnelle

3.3-Le clonage

Après la fusion, les hybridomes sécrétateurs d'anticorps détectés par un criblage, seront clonés.

Le clonage et le reclonage des hybridomes est essentiel et assure la monoclonalité des anticorps, et permet de se débarrasser des cellules non productrices qui peuvent se retrouver aussi bien dans la culture primaire que dans les dernières phases de la croissance.

La production en AcM peut décroître suite à l'accumulation de cellules non productrices qui ont perdu des chromosomes qui déterminaient leur caractère producteur (26).

Il existe deux principales méthodes de clonage largement utilisées :

le clonage sur gélose Agar qui est de moins en moins utilisé et le clonage par dilution limite.

Dans la première méthode, les cellules sont disséminées sur une gélose Agar et les colonies se développant à partir d'une seule cellule sont prélevées au hasard et transférées dans un milieu de culture liquide adéquat où seules les productrices d'AcM seront sélectionnées.

Cette méthode de clonage sur gélose Agar comporte des variantes techniques comme celle utilisée par Köhler et Milstein dans leur première expérience (32) ; la technique dite replica method (20).

Une autre variante est basée sur la présence d'immunoglobuline ayant une activité anticorps à la surface des cellules hybrides. En utilisant des antigènes fluorescents ou des antigènes liés à des microbilles fluorescentes, il est possible de marquer ces cellules hybrides qui pourront être détectées et séparées par le FACS (fluorescence activated cell sorter) (44).

Le clonage sur gélose Agar est complexe et long à réaliser et de plus certaines lignées de cellules de myélome comme la lignée X63.653 ne donne pas de bons résultats par cette procédure.

La seconde méthode de clonage est celle par dilution limite. Une des voies de cette méthode consiste à diluer les cellules hybrides jusqu'à obtenir moins d'une cellule par puits et à ajouter 10^6 thymocytes par puits dans les plaques de micro culture de 96 puits. Lorsque le rendement du clonage n'est pas connu, il est recommandé de faire une série de dilutions en transférant 50 μl de suspension cellulaire dans 150 μl de medium (milieu de culture) et ajouter 50 μl de cellules feeder (17).

Ces cellules feeder ou cellules nourricières秘rètent des facteurs de croissance et améliorent l'efficacité du clonage (18).

Les feeders sont en général des thymocytes (42, 35) ; des macrophages du péritoine (28) ; ou alors des cellules normales (21).

Ces feeders doivent être préparés et répartis dans les plaques de micro culture de 96 puits, puis placés à 37 °C un jour avant le clonage.

En plus de ces feeders on peut utiliser la solution OPI (oxaloacétate-pyruvate de sodium-insuline bovine) pour aider les clones à croître rapidement dans le milieu de culture.

Pour assurer la monoclonalité des anticorps il faudra recloner les clones testés positifs (26).

Pour notre étude nous avons adopté la méthode de clonage par dilution limite puisqu'elle est la plus adéquate pour la lignée de cellules de myélomes que nous avons utilisés pour la fusion (lignée X63Ag A653).

Chapitre II : Le virus de la FVR

1-Définition de l'agent pathogène

La fièvre de la Vallée du Rift ou hépatite enzootique est une anthroponozoonose due à un phlébovirus l'un des cinq genres de la famille des Bunyaviridae. Des épizooties du virus de la FVR peuvent provoquer des pathologies sévères tant chez l'animal que chez l'Homme entraînant des avortements, une morbidité et une mortalité élevée, ainsi que des épidémies de fièvres hémorragiques associées à d'autres syndromes (7, 46).

2-Epidémiologie-Transmission et Cliniques-Traitement et prévention

2.1- Epidémiologie

Le virus de la FVR a été isolé pour la première fois en 1931 pendant une épidémie d'un troupeau dans une ferme localisée dans la Vallée du Rift au Kenya (10).

Depuis 1931, des épizooties du virus de la FVR à l'origine d'avortements et de la mort des jeunes ongulés, ainsi que d'épidémies de fièvres hémorragiques associées à d'autres symptômes, ont été enregistrées en Afrique Subsaharienne et en Egypte (39).

Les épidémies les plus récentes se sont déclarées en Egypte en 1977-78 et en 1993 (38) ; dans le sud de la Mauritanie en 1987 (53) ; au Sénégal en 1987-1998 (14, 60) ; à Madagascar en 1990-91(47).

Les données sérologiques ont également mis en évidence une transmission active du virus dans toute l'Afrique de l'Ouest (63).

Ces résultats montrent l'extension de la maladie sur tout le continent africain et son introduction dans les continents européen, américain et asiatique serait d'un

grand danger. Malheureusement des cas ont été confirmés en Arabie Saoudite et au Yémen (62).

La FVR pose un problème de santé au niveau du bétail et chez l'Homme, ce qui entraîne des répercussions sur le plan économique et hygiénique. Ce qui fait que les taux élevés de morbidité et de mortalité observés lors d'une épidémie ralentit fortement la productivité en général. Il est donc nécessaire de trouver une méthode de détection précoce et rapide, de même qu'une méthode de surveillance de ce virus.

2.2-Transmission et Clinique

Le virus est transmis aux petits ruminants (moutons, chèvres, vaches, chameaux ...) par la piqûre d'insectes hématophages du genre Culex et Aedes (6, 19).

Dans les conditions expérimentales de très nombreuses voies de pénétration sont possibles chez les espèces sensibles notamment la voie sous-cutanée, intra péritonéale, intracérébrale.

La contamination directe à l'aide d'aérosols est facile aussi bien chez l'Homme que chez l'animal.

L'Homme se contamine par piqûre d'insectes vecteurs, mais aussi au contact de sang, de produits d'avortements ou de viande infectée (lors de la préparation des repas) (7).

Un rôle potentiel de réservoir de virus dans le cycle du VFVR au Sénégal pourrait être attribué à des rongeurs comme le rat (14).

Des épidémies s'observent surtout pendant les saisons de grande pluviométrie qui créent les conditions favorables à l'éclosion des œufs infectés de moustiques vecteurs (11). On ne connaît pas avec précision les facteurs déterminants de l'émergence des épidémies de FVR qui est une maladie pouvant être transmise

par des vecteurs, mais l'environnement et les conditions climatiques y jouent un rôle majeur (52).

Ainsi l'épidémie de 1987 a été reliée à la mise en eau du barrage de Diama sur le fleuve Sénégal et les foyers les plus récents montrent que des pluies supérieures à la moyenne pourraient contribuer aussi à l'expression de la maladie dans cette partie de l'Afrique (16).

La maladie se manifeste chez les animaux par une forte fièvre, un ictère une diarrhée sanguinolente, mais surtout par des avortements et une mortalité néonatale (49).

Chez l'Homme, la courte période d'incubation est suivie d'un syndrome grippal, avec installation brutale de fièvre, de céphalées, de myalgies (34). Ces symptômes durent en général 4 à 7 jours, après quoi la réponse immunitaire peut être détectée avec l'apparition d'IgM et d'IgG et la disparition du virus de la circulation sanguine (41).

La plupart des cas humains sont relativement bénins, mais une petite proportion de patients développe des complications sous la forme d'un ou de plusieurs syndromes reconnaissables à type de rétinite, méningo-encéphalite ou alors de fièvre hémorragique. Cette dernière complication est la plus grave avec des taux de létalité élevés, environ 50%.

2.3-Traitement et prévention

La Ribavirine =Rebetol est utilisée comme médicament antiviral. Les expériences de labo ont montré qu'elle inhibait la croissance du virus, mais elle n'a pas fait l'objet d'évaluations cliniques. Elle est disponible en aérosol, elle est aussi utilisée en per os et en iv. Elle présente comme effets secondaires des anémies dose dépendante, des nausées, flatulence, insomnie.*

Elle est contre indiquée chez les femelles gestantes car elle provoque des avortements. Aucun traitement spécifique n'est requis chez l'Homme dont la

plupart des cas sont bénins. Pour les cas graves, le principe est avant tout d'instaurer un traitement général d'appoint.

Des programmes durables de vaccination des animaux permettent de prévenir la FVR. Des vaccins atténués ou tués ont été mis au point pour l'usage vétérinaire. Un vaccin inactivé à usage humain a été mis au point, mais il n'est ni homologué ni commercialisé et on l'a utilisé expérimentalement pour protéger les vétérinaires et le personnel de laboratoire courant un risque élevé d'exposition à la FVR.

3-Diagnostic de laboratoire (16)

Le diagnostic clinique doit être confirmé au laboratoire par des techniques virologiques, sérologiques, histopathologiques, génétiques...

Les prélèvements à effectuer pour le diagnostic de laboratoire sont :

- sang prélevé sur tube sec et hépariné, de préférence au moment du pic fébrile
- prélèvements d'organes : foie, rate, reins et nœuds lymphatiques
- prélèvement de cerveau chez les avortons car c'est la dernière partie du cadavre à être putréfiée.

3.1- Les méthodes virologiques

Isolement du virus

C'est la technique la plus sûre de diagnostic de la FVR. Elle consiste à isoler et à identifier le virus sur des animaux de laboratoire (souris, hamster) ou sur culture cellulaire. Le virus est l'un des plus rares qui peut tuer ces animaux de laboratoire par n'importe quelle voie d'inoculation (IC, IP ...). Mais cette technique présente des risques liés à la manipulation de produits hautement infectieux. La technique d'isolation du virus de la FVR la plus sensible est

celle qui utilise l'inoculation d'animaux comme les souriceaux nouveau-nés (SNN), les hamsters et les agneaux. L'inoculum est constitué d'une suspension virale. La présence du virus se manifeste par la mort des SNN au bout de 2 à 3 jours après l'inoculation par voie intracérébrale. Les fragments d'animaux morts ou ayant présenté des signes de la maladie sont alors testés avec des sérum spécifiques connus.

La 2^{nde} technique d'isolement du virus utilise l'inoculation de cellules sensibles comme les cellules Vero et la présence du virus se manifeste par un effet cytopathique caractéristique au bout de 2 à 4 jours.

L'identification peut se faire par immunofluorescence directe.

3.2- Les méthodes sérologiques

Les techniques les plus courantes sont l'immunofluorescence, la réduction des plages et les tests immunoenzymatiques pour rechercher les Ac IgG et IgM.

***La technique ELISA**

Elle est particulièrement recommandée en raison de sa spécificité et de sa sensibilité. Elle permet de détecter les différentes classes d'Ig pour déceler une infection récente (présence d'IgM) ou ancienne (présence d'IgG).

***La technique de neutralisation virale**

C'est la technique de référence pour FVR, car elle est la plus spécifique et elle est utilisable dès le 3^{ème} jour de l'infection. Toutefois, elle nécessite l'utilisation de virus vivant et de cellules en culture.

***La technique d'immunofluorescence**

C'est une technique d'application facile. Très spécifique, l'immunofluorescence sur calque de foie, de rate ou de cerveau d'animal sacrifié en hyperthermie permet d'avoir un diagnostic rapide de la FVR. Il permet d'être utilisé pour identifier la présence de virus dans les prélèvements d'organes d'animaux suspects mais aussi pour déceler les anticorps de la FVR dans le sérum d'animaux.

3.3- La méthode histopathologique

C'est une technique pratique, rapide et très spécifique du diagnostic de la FVR. On l'applique sur des fragments de foie placés dans l'eau physiologique formolée à 10% et consiste à rechercher dans les cellules hépatiques des inclusions nucléaires acidophiles, caractéristiques de FVR.

3.4- Les méthodes génétiques

La détection du virus peut se faire par amplification génique (PCR) et hybridation dans les laboratoires de référence.

4 - Cibles antigéniques de la réponse immunitaire

Le virus de la FVR est un virus enveloppé d'une centaine de nanomètres de diamètre. Son génome est constitué de 3 segments d'ARN(L, M, et S) qui expriment les protéines structurales et non structurales du virus.

Le segment L code pour la protéine L (40). La particule virale enveloppée possède 2 glycoprotéines de surface G1 et G2 codées par le segment M (9).

Ce segment M code également pour les protéines non structurales de 78Kda et 14Kda (8). Les protéines codées par le segment M sont en partie responsables de l'induction de la réponse immunitaire et d'anticorps neutralisants. Les glycoprotéines permettent aussi la fusion cellulaire et seraient porteuses de marqueurs de virulence (15).

Le segment S code pour la nucléoprotéine N et pour la protéine non structurale NSs (22).

Les protéines non structurales par définition, ne sont pas présentes dans la particule virale, mais s'expriment dans les cellules infectées. La protéine non structurale NSs phosphorylée, est très caractéristique de l'infection par le VFVR, car elle s'accumule dans le noyau et forme des structures filamenteuses qui sont visibles dans les cellules infectées comme dans les hépatocytes d'animaux infectés et permet de poser le diagnostic (5).

Le virus de la FVR présente des souches atténuées. C'est ainsi que la souche sauvage ZH548 très pathogène chez les souris (Balb et Swiss) a été atténuée après 12 passages sur des cellules humaines en présence d'un agent mutagène la 5-fluorouracyl. Il en a résulté la souche atténuée MP12 qui porte au niveau de ses 2 segments L et M de nombreux facteurs d'atténuation, alors que le segment S en présente très peu.

L'atténuation de la souche CL13 (clone 13) est due à la déletion de 70% de la région codant pour la protéine non structurale NSs qui a pour rôle d'empêcher la fabrication d'interféron inhibiteur de la multiplication virale.

Dans notre étude nous avons utilisé les 2 souches atténuées MP12 et CL13 pour produire des Ac dirigés contre les différentes protéines du virus Rift.

Chapitre I : Objectifs

La plupart des épidémies observées ces dernières années en Afrique sont dues à des virus et notamment à des arbovirus. L'étude de nombre de ces agents pathogènes est restée incomplète à cause de l'absence de réactifs appropriés. Les anticorps ont pendant longtemps joué un rôle essentiel dans le diagnostic de certaines maladies, mais leur qualité a cependant toujours été limitée par leur nature polyclonale.

La technologie des AcM décrite depuis 1975 par César Milstein et Georges Köhler a permis d'obtenir d'énormes quantités d'anticorps homogènes, absolument purs et monospécifiques dirigés contre une variété infinie d'antigènes, révolutionnant ainsi la compréhension à la fois de l'immunologie clinique et moléculaire de certaines familles de virus.

L'objectif de ce travail est d'une part de présenter la technologie de production des AcM et d'autre part de l'appliquer en vue de l'obtention d'AcM dirigés contre les différentes protéines des souches atténuées du VFVR dans le but d'améliorer l'identification et le diagnostic de ce virus.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1-Matériel

1.1- Matériel biologique

*Souris Balb/c et souriceaux nouveau-nés entretenus dans l'animalerie de l'institut.

*Souches virales :

- clone 13 : souche atténuée pour les rongeurs, clonée à partir d'un isolat du virus RVF isolé en République de Centre Afrique.
- MP12 : souche atténuée par 12 passages successifs en présence du mutagène 5-fluorouracyle.

*Lignées cellulaires

- cellules VERO : ce sont des cellules de rein de singe vert d'Afrique (12).
 - cellules X63AgA653 : il s'agit de cellules de myélome murin. Elles seront fusionnées avec des splénocytes de souris.
 - cellules tumorales 180 TG : provenant d'un sarcome fibroblastique de souris
- * Ascite Rift Zinga MAF4

1.2-Matériel techniques de laboratoire

Congélateur (-70°C) : REVCO

Centrifugeuse réfrigérée : Sigma 3k-2

Centrifugeuse réfrigérée : Sigma 112

Réfrigérateur Fides

Hotte à flux laminaire Flufrance

Etuve sèche Memmert

Etuve à CO2 : Napco

Microscope optique Leica

Bain-marie Ets Jean Robin

Pipet aid

Eppendorf Biopur : 1.5ml, 2.5ml, 5ml

Container de congélation Cryo Nalgene

Gants SafeSkin

Bain de glace

Boites de culture cellulaire Corning : 25cm², 75cm², 150cm²

Pipette eppendorf

Pipette Falcon

Eppendorf multipipette plus

Lames et lamelles CML France

Tube à congeler Nunc

Tube à centrifuger Nunc : 50ml, et 15ml

Plaques de culture de 6, 12, et 24 puits : Nunclon TM

Plaques de 96 puits pour ELISA Labsystems Cliniplate

Parafilm « M »

Cônes Gigson

Vortex Fisher Bioblock scientific

Agitateur magnétique chauffant 92619 Bioblock Scientific

Seringues 1ml Pronto Siringa Gliss

Seringues 5ml 5Penta

Balance Mettler 2000

Eprouvette Kartell

Fiaules jaugées Goldbrand

Mortier et pilon en porcelaine

Lecteur ELISA Labsystem Multiskan Ascent

Lame pour IFI PolyLabo

Membrane millipore Millex

Ciseaux

1.3-Tampons et réactifs

Tampon borate

Préparer:

NaCl : 8.76g dans 100ml d'eau distillée

Acide borique : 3.1g

NaOH 1N : 4g

Prélever :

80ml NaCl

100ml Acide borique

24ml NaOH

Ajuster à 1L avec de l'eau distillée. Le pH doit être à 9

Tampon Tris à pH 8.5

Beta propionolactone

PBS (10x) W/O Calcium and Magnesium Gibco TM

Acide sulfurique 95% min Prolabo

Bleu Evans Sigma

Chlorure de Sodium 0.9% Laboratoire Renaudin

3,3',5,5'-Tetraméthyl-Benzidine (TMB) liquide Sigma utilisé comme substrat

Adjuvant complet et incomplet de Freund Sigma (F-5881)

Pyruvate de Sodium 100ml Gibco BRL

L-glutamine 200 MM (100x) Gibco BRL

Anti Mouse IgG et Anti Mouse IgM (μ chain specific) 1ml, peroxidase conjugate Sigma

Sérum de cheval. Bayer

Sérum de veau foetal. Gibco BRL

2,6,10,14 –Tetramethyl-Pentadecane Sigma (Pristane)

Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate) Bio-Rad

Pénicilline-Streptomycin lyophilised. Sigma

Trypsin 1:250 from porcine pancreas Sigma

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) anhydrous. Sigma

Préparation solution Azaguanine

Peser 120mg d’Azaguanine

Dissoudre dans 40ml NaOH 0.1M. Compléter avec 60ml d’eau distillée. Ceci constitue la solution mère à filtrer avec une membrane millipore 0.22μ

Polyéthylène glycol 1000. Merck

Azasérine

DMSO (Diméthyle sulfoxyde)

Azide de sodium 1%

Milieu de culture pour hybridomes et clones

Milieu de base ou minimum essential medium (MEM) (milieu incomplet) : il contient des acides aminés, du carbonate de sodium et du pyruvate de sodium.

Composition pour 5L :

Eau minérale : 5L

Pyruvate de Sodium : 50ml

NaHCO₃ : 11g

Peni-Strepto : 1%

MEM de Eagle avec AANE sans sel de Earle avec L-glutamine/ sans NaHCO₃, poudre sèche. réf : 010299. Eurobio

MEM de Eagle avec AANE et sel de Earle avec L-glutamine/ sans NaHCO₃, poudre sèche. Ref : 010265 Eurobio

Mesurer le pH à 7.2

Filtrer sous la hotte et conserver au réfrigérateur à +4°C

Milieu complet (avec sérum)

Il se prépare à partir du milieu de base auquel est ajouté du sérum de cheval décomplémenté à 10%, une solution d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine) à 1% et de la L-glutamine à 1%.

Milieu - Azaguanine

C'est du milieu complet additionné d'une solution d'azaguanine à la concentration finale de 20µg/ml. Il permet de maintenir le caractère HGPRT- des cellules de myélome.

Milieu sélectif des hybridomes : pour 500ml

Milieu complet : 500ml

Azaserine : 500µl

Hypoxanthine : 2.5ml

Ce milieu empêche la survie des cellules de myélome non fusionnées ou fusionnées entre elles.

Solution OPI 100x pour 100ml :

Oxaloacétate 1,5g

Pyruvate de sodium 500mg

Eau distillée 100ml

Stérilisation par filtration sur membrane millipore

Insuline bovine 2000UI

Milieu de culture des cellules VERO

Milieu L-15 : milieu de base pour les cellules VERO

Composition pour 10L :

Dissoudre dans 10L d'eau distillée :

L-15 (Leibovitz) Medium W/ L-glutamine W/ L-Aminoacids poudre sèche
pour 10L de solution. Gibco TM

Pyruvate de Sodium : 100ml

Peni-Strepto : 1%

Mesurer le pH à 7.2- 7.4

Filtrer sous la hotte et conserver au réfrigérateur à +4°C.

Milieu L-15 complet : pour 500ml

Milieu de base L-15 : 450ml

Sérum de veau foetal décomplémenté : 50ml

2-Méthodes

2.1- Préparation des antigènes

2.1.1- A partir de cultures cellulaires

2.1.1.1-Culture de cellules VERO

Les cellules VERO constituent une lignée continue de cellules qui poussent en monocouche en adhérant au plancher de la boîte de culture dans du milieu L-15 additionné d'antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine) et de sérum de veau décomplémenté.

Lorsque la boîte est confluente, il faudra faire un certain nombre de passages pour multiplier le nombre de boîte.

Pour se faire il faut chauffer le milieu de culture, la Trypsine-EDTA, et le PBS stérile dans un bain-marie à 37°C.

Le surnageant de la boîte de culture est jeté pour pouvoir laver le tapis cellulaire avec du PBS stérile afin d'éliminer le sérum de veau fœtal qui inhibe la Trypsine-EDTA.

Si l'on dispose d'une boîte de 75cm², un volume de 2ml de Trypsine-EDTA suffira pour faire décoller et séparer les cellules lorsque la boîte est placée à l'étuve à 37°C. Ce décollement du tapis cellulaire est observé au microscope optique au bout de 5 mn environ et à ce stade, l'addition de 5ml de milieu L-15 complet arrête l'action de la Trypsine-EDTA.

La suspension cellulaire est centrifugée à 1000 trs/mn pendant 5mn, puis le culot est repris dans 2ml de milieu complet et répartit dans 2 flasques. Ces boîtes sont

remises en culture dans l'étuve sèche à 37°C après addition de 30 ml de milieu complet. Elles deviennent confluentes au bout de 2 à 3 jours.

Le passage de cellules VERO doit se faire sous la hotte à flux laminaire pour assurer la stérilité et éviter la contamination des cultures.

2.1.1.2-Infection des cellules VERO

L'infection se fait avec une boîte de culture trypsinée depuis 24 ou 48h dont le tapis cellulaire n'est pas trop confluente pour permettre au virus de se multiplier dans des cellules en croissance. La procédure d'infection est la même pour les souches MP12 et CL13 en commençant par décongeler un aliquot de notre stock de virus (MP12 ou CL13) obtenu par le même procédé et qui titre 10^7 PFU.

Le tapis cellulaire est lavé avec du PBS stérile.

Avec une boîte de 75cm², il faut répandre 500µl de suspension virale sur le tapis cellulaire, puis la boîte est placée à l'étuve à 37°C pendant 1h en prenant soin de la remuer toutes les 15mn pour assurer l'adhérence du virus aux cellules. Au bout d'1h, la boîte est sortie de l'étuve pour y ajouter 30ml de milieu complet, puis elle est remise en culture dans l'étuve sèche à 37°C.

Pour la souche MP12, l'effet cytopathique est observé au bout de 3 jours après l'infection. Le tapis cellulaire est complètement décollé, les cellules sont devenues granuleuses et le milieu acidifié.

Pour la souche CL13, l'effet cytopathique s'observe 4 jours après l'infection avec un tapis cellulaire non décollé, des cellules granuleuses, très effilées formant une toile d'araignée et un milieu acidifié.

Une partie du surnageant est aliquotée et conservée à -70°C pour servir de stock de travail (immunisation et infection). L'autre partie est inactivée avec de la bétapropiolactone, précipitée au PEG 6000, puis centrifugée. Après précipitation le culot est repris dans du PBS, aliquoté et conservé au congélateur à -20°C. Les

cellules sont lavées et déposées sur des lames spéciales pour immunofluorescence destinées à la caractérisation future des AcM obtenus.

2.1.2- A partir de cerveau de souriceaux nouveau-nés (SNN)

La procédure est la même pour les souches CL13 et MP12.

Il faut injecter par voie intracérébrale 20 μ l de suspension virale titrée à 10⁷PFU à chaque souriceau d'un lot de 5 SNN de 2 ou 3 jours. Ces souriceaux sont surveillés quotidiennement et au bout de 2 jours après l'infection ils meurent et seront conservés à -70°C. La souche CL13 est plus virulente que la souche MP12 puisque les souriceaux infectés avec cette souche meurent en premier.

Les cerveaux de ces souriceaux sont par la suite prélevés et broyés dans un mortier en porcelaine en y ajoutant 2ml de milieu L-15 complet. Le broyat est centrifugé à 10000 trs/mn pendant 10mn. Ce surnageant est ensuite inoculé à un autre lot de SNN par le même procédé que la première fois.

Plusieurs passages sont nécessaires pour augmenter le titre viral. Les souriceaux infectés lors du 4^{ème} passage sont utilisés pour préparer l'Ag de cerveau. Après avoir décongelé les souriceaux, leurs cerveaux sont aspirés à l'aide d'une seringue et broyés dans un mortier en porcelaine en y ajoutant une quantité de tampon borate égale au volume des cerveaux. Il est nécessaire d'ajouter une petite quantité de bétapropiolactone (0.03%) pour inactiver le virus. Le volume total est mesuré avec une pipette avant d'y ajouter le 10^{ème} de ce volume de tampon Tris (pH =8.5).

Le tout est homogénéisé et centrifugé à 10000 trs/mn pendant 20mn, puis le surnageant est aliquoté et conservé à -70°C.

Pour ces manipulations il faut impérativement travailler sous la hotte à flux laminaire.

Cet antigène de cerveau du 4^{ème} passage est titré par ELISA en comparaison à l'antigène du 1^{er} passage et par rapport à l'antigène Rift de référence (voir titrage antigène de cerveau).

Cet antigène de cerveau servira à tester par ELISA les hybridomes et les clones. De l'antigène de cerveau normal (non infecté) est préparé et servira de témoin négatif dans les tests ELISA.

2.2-Préparation des ascites polyclonaux

Cet ascite est préparé selon la même méthode pour les 2 souches virales et il servira de témoin pour tester les hybridomes et les clones après la fusion.

L'ascite est préparé chez deux lots de 5 souris Balb/c de 8 à 12 semaines pour les 2 souches du virus selon le protocole suivant en utilisant la suspension virale obtenue par culture cellulaire :

Jo : injecter 500µl de suspension virale à chaque souris par voie intra péritonéale (ip)

J5 : préparer une émulsion avec 100µl d'adjuvant complet de Freund et 500µl de suspension virale. Injecter par voie ip 500µl de l'émulsion à chaque souris ;

J10 : injecter à chaque souris 500µl de suspension virale par voie intra péritonéale ;

J12 : prélever 1ml de sarcome ascitique TG180 (d'une souris ascitique) et le diluer avec de l'eau physiologique puis injecter 500µl à chaque souris par voie intra péritonéale ;

J15 : injecter 500µl de suspension virale à chaque souris par voie intra péritonéale ;

J28 : En observant et en palpant l'abdomen des souris, il apparaît qu'elles ont développé de l'ascite. Dès lors, des ponctions répétées sont effectuées au niveau du péritoine des souris. Le liquide d'ascite est centrifugé à 7000trs/mn pendant

10mn, le surnageant est récupéré et conservé à -20°C après y avoir ajouté une petite quantité d'azide de sodium.

Les ascites de CL13 et de MP12 sont titrés par rapport à l'ascite de référence Zinga par ELISA (voir titrage ascites polyclonaux).

2.3-Immunisation

La production d'AcM est un long processus qui commence par l'immunisation c'est à dire la sensibilisation de la souris avec l'Ag contre lequel on veut obtenir des Ac.

Nous avons utilisé le stock de virus que nous avons préparé par culture cellulaire. Des souris Balb/c sont immunisées selon un protocole court avec une injection tous les 10 jours. Pour la première inoculation, la suspension virale est émulsionnée avec de l'adjuvant complet de Freund en proportion égale et pour les injections suivantes, l'éмульSION est préparée avec de l'adjuvant incomplet de Freund.

Les inoculations se font soit par voie sous cutanée, soit par voie intra péritonéale à raison de 100µl d'émuльSION par souris. Après la 4^{ème} injection, une saignée à l'œil est effectuée chez chaque souris afin de récupérer le sérum pour tester leur réponse polyclonale par ELISA. Les souris qui répondent le mieux au virus, seront utilisées pour les fusions.

2.4-Fusion

2.4.1-Avant la fusion

La souris qui doit être utilisée pour chaque fusion subit un boost 3 jours avant, c'est à dire une injection de 500µl de suspension virale par voie intra péritonéale dans le but de réactiver la réponse immunitaire.

Il faut également décongeler les cellules de myélome X63 15 jours avant la fusion et les remettre en culture dans des boîtes de Pétri ou dans des flasques.

Préparer les milieux nécessaires (voir leur composition dans matériel) à savoir :

-Milieu sans sérum pour la décongélation et le lavage des cellules avant la fusion

-Milieu complet (avec sérum de cheval) pour la culture des cellules et l'arrêt de l'action du PEG lors de la fusion

-Milieu complet azaguanine pour la culture des X63 avant la fusion pour conserver le caractère HGPRT-

- Milieu sélectif utilisé pour sélectionner les hybridomes dans les proportions suivantes : 1/3 milieu complet et 2/3 milieu sélectif pour l'élimination des X63 non fusionnées ou fusionnées entre elles

- PEG 1000 (polyéthyléneglycol) qui fragilise et provoque des trous dans les parois permettant ainsi la fusion et il faut 0.8ml pour une rate.

2.4.2-le jour de la fusion

Les milieux sont placés à 37°C et le matériel nécessaire à la fusion est mis à porter de main.

2.4.2.1-Préparation des cellules de myélome X63

Les cellules doivent être lavées pour éliminer les protéines du sérum de cheval utilisé dans le milieu complet, ces protéines inhibent l'action du PEG. Tous les lavages se font avec du milieu sans sérum.

Il faut donc pooler toutes les boîtes en tubes coniques pour les lavages, centrifuger à 1000 ou 1200 trs/mn pendant 5 à 10 mn. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 40ml de milieu sans sérum. Un aliquot de cette suspension est prélevé pour compter les cellules sur Malassez. Un second lavage est nécessaire avant de reprendre le culot dans 40ml de milieu sans sérum en

évitant d'utiliser une pipette car on perdrait beaucoup de cellules. Pour se faire, il faut racler le tube fermé contre la grille de la hotte pour dissocier le culot en faisant attention de ne pas en mettre trop sur les parois du tube, puis ajouter le milieu et agiter doucement.

2.4.2.2-Préparation des cellules spléniques

Avant de sacrifier la souris, une saignée à l'œil est effectuée pour prélever du sang afin de récupérer le sérum qui servira de témoin positif lors du criblage de la fusion.

La souris sacrifiée est transportée dans un bêcher rempli d'alcool car aucun animal non désinfecté ne doit être introduit sous la hotte.

Un bêcher recouvert avec un filtre-tamis stérile est préparé pour la dissociation de la rate. Le filtre est humidifié avec une goutte de milieu sans sérum.

La souris est fixée sur le ventre contre une planche de liège préalablement désinfectée à l'alcool. A l'aide d'une pince et de gros ciseaux, la peau est enlevée en tirant vers la tête de la souris. La rate se trouve sur le côté gauche de la souris, sous les côtes. Elle est de forme et de couleur bien spécifiques : plus allongée et d'un rouge plus foncé que le rein.

Avec des ciseaux fins, il faut découper autour de la rate et la prélevée à l'aide d'une pince à crochet. La rate est débarrassée des matières grasses qui l'enveloppent puis déposée sur le bêcher-tamis. Elle est découpée en petits morceaux avec les ciseaux à bout recourbés et arrondis afin de ne pas percer le tamis. Ces morceaux sont écrasés à l'aide du fond d'un tube de Khan stérile, et le broyat est passé à travers le tamis avec du milieu sans sérum (ne pas utiliser une quantité supérieure à 20ml). Cette suspension est récoltée dans un tube conique, de même que le liquide de rinçage du bêcher de manière à compléter la suspension cellulaire à 20ml. Le comptage de ces splénocytes se fait également sur cellule de Malassez, mais il faut les colorer préalablement au

bleu trypan. Pour se faire, il faut mélanger dans un tube 50 μ l de suspension cellulaire, 5 μ l de bleu trypan et 450 μ l d'eau physiologique. La chambre de Malassez est remplie avec cette suspension. Le bleu trypan colore les cellules mortes en bleu et permet ainsi de ne pas les compter. Il faut également faire attention à ne pas compter les globules rouges contenus dans la suspension cellulaire suite au broyage de la rate. Les globules rouges sont plus petits que les splénocytes. En faisant varier la mise au point du microscope, il apparaît que leur membrane est plus épaisse (ce qui les fait ressembler à une petite bouée) et leur cytoplasme plus jaune alors que les splénocytes sont plus gros, ont une membrane moins épaisse et un cytoplasme d'aspect plus granuleux.

Une rate de souris bien immunisée donne environ 10^8 cellules.

Pour la fusion avec MP12, la souris a donné 2.10^8 splénocytes, alors que pour la fusion avec CL13, la souris dont la rate était de plus petite taille, a donné 5.10^7 splénocytes.

2.4.2.3-Calcul du mélange de fusion

Il faut tenir compte du nombre total de cellules, car la fusion doit se faire dans un rapport de 1 X63 pour 5 splénocytes. Pour obtenir ce rapport, il faut calculer le nombre de X63 à prélever de la suspension. Pour les splénocytes, la rate entière est généralement utilisée (soit les 20ml de la suspension cellulaire).

2.4.2.4-Fusion

Les deux suspensions cellulaires sont mélangées et centrifugées à 1000 trs/mn pendant 5 mn après quoi le surnageant est rejeté. Le culot est dissocié en raclant le tube contre la grille de la hotte sans trop remonter sur les parois du tube.

A partir de ce stade, il faut impérativement respecter les temps donnés pour les opérations suivantes :

- Ajouter le PEG (800 μ l pour une rate) sur le bord du tube et goutte à goutte en 30 secondes environ ;
- Attendre 3 minutes en agitant tout doucement le tube à la température ambiante ;
- Arrêter la réaction en ajoutant goutte à goutte en 5 minutes 1ml de milieu complet pour arrêter l'action du PEG qui léserait trop les cellules ;
- Ajouter goutte à goutte 10ml de milieu complet pour continuer à arrêter l'action du PEG mais les cellules continuent de fusionner.

2.4.2.5- Calcul du nombre de plaques de 24 puits à utiliser

Les cellules fusionnées sont diluées dans un mélange de milieux de culture.

Le mélange de fusion est réparti en plaques de culture de 24 puits à raison de 1ml par puits. Le nombre est calculé en fonction du nombre de X63 inoculées dans le mélange de fusion et il faut 10^5 cellules par puits.

Pour F6MP12, 19 plaques ont été utilisées et pour F7CL13 9 plaques.

Une fois ce nombre déterminé, la quantité de milieu nécessaire est calculée.

Le milieu est préparé dans les proportions suivantes :

1/3 de milieu complet

2/3 de milieu sélectif

Les plaques sont alors placées à 37°C à l'étuve à CO₂. La fusion est surveillée pour s'assurer qu'elle n'est pas contaminée en prenant soin de ne pas faire sortir trop tôt les plaques de l'étuve car cela gènerait les cellules en culture.

2.4.2.6-Changement du milieu de fusion

Une semaine après la fusion, il est recommandé de changer le milieu de culture car après son effet sélectif, il ne contient plus d'éléments nutritifs et peut de plus devenir toxique pour les hybridomes. D'autre part, les puits sont pleins de débris

cellulaires qui peuvent nuire à leur croissance. Il faut enlever le milieu avec une pipette de 1000 et remettre du milieu neuf.

La croissance des hybridomes est surveillée pendant la semaine suivante et si tout se passe bien, on peut commencer le criblage ou sélection des hybridomes.

2.5- Sélection des hybridomes

Le criblage se fait par un test ELISA direct et il consiste à tester et à sélectionner les hybridomes sécréteurs d'anticorps.

Il faut donc repérer au microscope les puits dont les cellules ont bien poussé et les marquer. Lors du criblage le sérum de la souris utilisée pour la fusion servira de témoin positif.

Les plaques sont coatées en Ag de cerveau Rift de référence dilué au 100^{ème} dans du PBS 1X (Ag positif) et en Ag de cerveau normal dilué au 100^{ème} dans du PBS 1x (Ag négatif), puis placées à 4°C pendant une nuit.

Mode opératoire

Toutes les dilutions se font dans du PTL (PBS/TWEEN/LAIT)

9ml de PBS 1X / Tween20 0,05% + lait en poudre 1g/100ml

Ce diluant fait également office de saturant pour les sites non spécifiques.

La solution de lavage est constituée de PBS/Tween20

-Faire sortir les plaques.

-Laver 6 fois pour éliminer l'excès d'antigène non fixé.

-Déposer des témoins :

. un témoin positif (puits B3, 100µl de sérum de fusion dilué au 100^{ème})

. un blanc (puits C3, 100µl de milieu ERH) bruit de fond du milieu de culture

-Déposer côte à côte et pour chaque puits à tester : 100µl de surnageant de culture d'hybridome dans un puits marqué avec l'Ag de cerveau Rift et 100 µl dans un puits marqué par l'Ag de cerveau normal.

-Incuber 2h à 37°C

-Laver 6 fois

-Déposer 100µl par puits de conjugué Anti IgG souris marqué à la peroxydase dilué au 10000^{ème} ;

-Incuber 1h à 37°C ;

-Laver 6 fois ;

-Déposer 100µl par puits de substrat TMB ;

-Laisser réagir 5 à 15 minutes à l'abri de la lumière ;

-Arrêter la réaction en ajoutant 100µl/ d'Acide sulfurique 4N ;

-Lire les DO à 450 nm.

Les hybridomes positifs sont amplifiés en flasques de 25 cm². Ils seront contrôlés à plusieurs reprises par la même technique ELISA pour vérifier leur stabilité, puis seront clonés et congelés.

La congélation se fait dans des tubes cryo. (NUNC) sur lesquels sont marqués le nom de l'hybridome et la date. Pour la congélation, il faut commencer par centrifuger les cellules, puis éliminer le surnageant, le culot est repris dans un milieu de congélation froid constitué de sérum de cheval à 95% et de DMSO à 5%. Pour un hybridome, il est possible de faire une ou deux ampoules de congélation selon le culot, et chaque ampoule peut contenir 0,5ml. Il est impératif de travailler rapidement en gardant les cellules sur la glace, puis les mettre au congélateur à -20°C, les passer ensuite au congélateur à -80°C car les cellules ne résistent pas une nuit à -20°C. Plus tard, les cellules seront conservées dans l'azote liquide et le transport se fera sur carboglace. Cette descente en température est progressive pour préserver les cellules.

2.6-Clonage

Les hybridomes sécréteurs d'Ac sont clonés par la technique des dilutions limites et l'objectif est d'obtenir des cellules au génome identique ou clones cellulaires. L'anticorps produit par chaque clone est dit monoclonal, il est parfaitement pur et réagit spécifiquement face à l'Ag d'immunisation.

Ce clonage peut être fait au moment de la première congélation d'un hybridome ou à partir d'un puits de 1ml.

Après avoir remis les cellules en suspension, un aliquot est prélevé et compté sur lame de Malassez. La suspension cellulaire est par la suite diluée de manière à obtenir environ 60 cellules pour 20ml de milieu complet. Dans le cas du clonage des hybridomes de la fusion avec le CL13, le milieu complet est additionné d'OPI pour l'enrichir en facteurs de croissance.

Mode opératoire

Après le comptage, la dilution se fait en cascade de 10^{ème} en 10^{ème} (100µl de suspension cellulaire précédente + 900µl de milieu complet) selon le principe des dilutions limite. Statistiquement cela doit conduire à l'obtention d'au plus une cellule par puits. Cette procédure permettra ainsi d'être sûre de l'origine monoclonale de l'Ac sécrété. A partir de la dernière dilution, le volume nécessaire pour avoir ces 60 cellules est prélevé et transféré dans 20ml de milieu complet. Cette suspension cellulaire est ensuite répartie en plaques de 96 puits à raison de 200µl par puits.

Environ une semaine après, il devient possible de repérer au microscope optique l'apparition des clones. Ces clones seront testés par ELISA (de la même façon que pour le criblage) dès que les cellules auront suffisamment poussé.

Tous les clones ne seront pas positifs car un puits de fusion contient des hybridomes sécréteurs et des hybridomes non sécréteurs. D'autre part, un hybridome peut perdre sa positivité du fait de la sélection chromosomique et éliminer le gène codant pour la sécrétion de l'Ac.

Les clones positifs sont transférés en plaque de 12 puits, puis en boîtes de 25 cm². Ils seront contrôlés à plusieurs reprises par ELISA pour vérifier leur positivité. A partir de ces boîtes, on fera 4 ampoules de congélation comme avec les hybridomes.

Ces clones pourront être par la suite injectés à des souris pristanées pour la production d'ascite monoclonale.

Chapitre III : Résultats

L'objectif principal de notre étude était de produire des AcM dirigés contre les différentes protéines des souches atténuées du virus de la fièvre de la vallée du Rift. Nous avons été amenés à fusionner des lymphocytes B de souris immunisées contre ces souches atténuées avec des cellules de myélome murin pour produire des hybrides cellulaires. La sélection des hybridomes et des clones sécréteurs d'Ac spécifiques par ELISA a nécessité l'usage d'Ag et d'ascites polyclonaux comme témoins.

Les résultats présentés concernent donc, la préparation de ces Ag et de ces ascites en plus des résultats des fusions cellulaires effectuées.

1-Titrage Ag de cerveau

C'est par la technique d'isolement du virus la plus sûre que nous avons procédé pour obtenir cet Ag. Elle a consisté à inoculer par voie intracérébrale la suspension virale à des souriceaux nouveau-nés (SNN), puis à récupérer leur cerveau après la mort des animaux pour en faire une autre suspension virale. Cette opération constitue un passage et elle a été répétée quatre fois en partant toujours de la suspension virale du passage précédent. Ceci dans le but de permettre au virus de se multiplier davantage et d'accroître ainsi le titre viral de l'Ag préparé. Les Ag de cerveau du premier passage (MP12/1, CL13/1) et ceux du 4^{ème} passage (MP12/4, CL13/4) sont titrés en comparaison à l'Ag de référence. L'analyse des courbes de la figure 2 montre que le titre viral de l'Ag du 4^{ème} passage de la souche MP12 (MP12/4) a considérablement augmenté au

cours des passages jusqu'à même dépasser celui de l'Ag de référence. Dans le cas de la souche CL13, la figure 3 nous révèle que le titre viral de l'Ag du 4^{ème} passage (CL13/4) est nettement plus élevé que celui du premier passage (CL13/1). Ces résultats montrent l'utilité d'avoir effectué plusieurs passages pour avoir un antigène sensible.

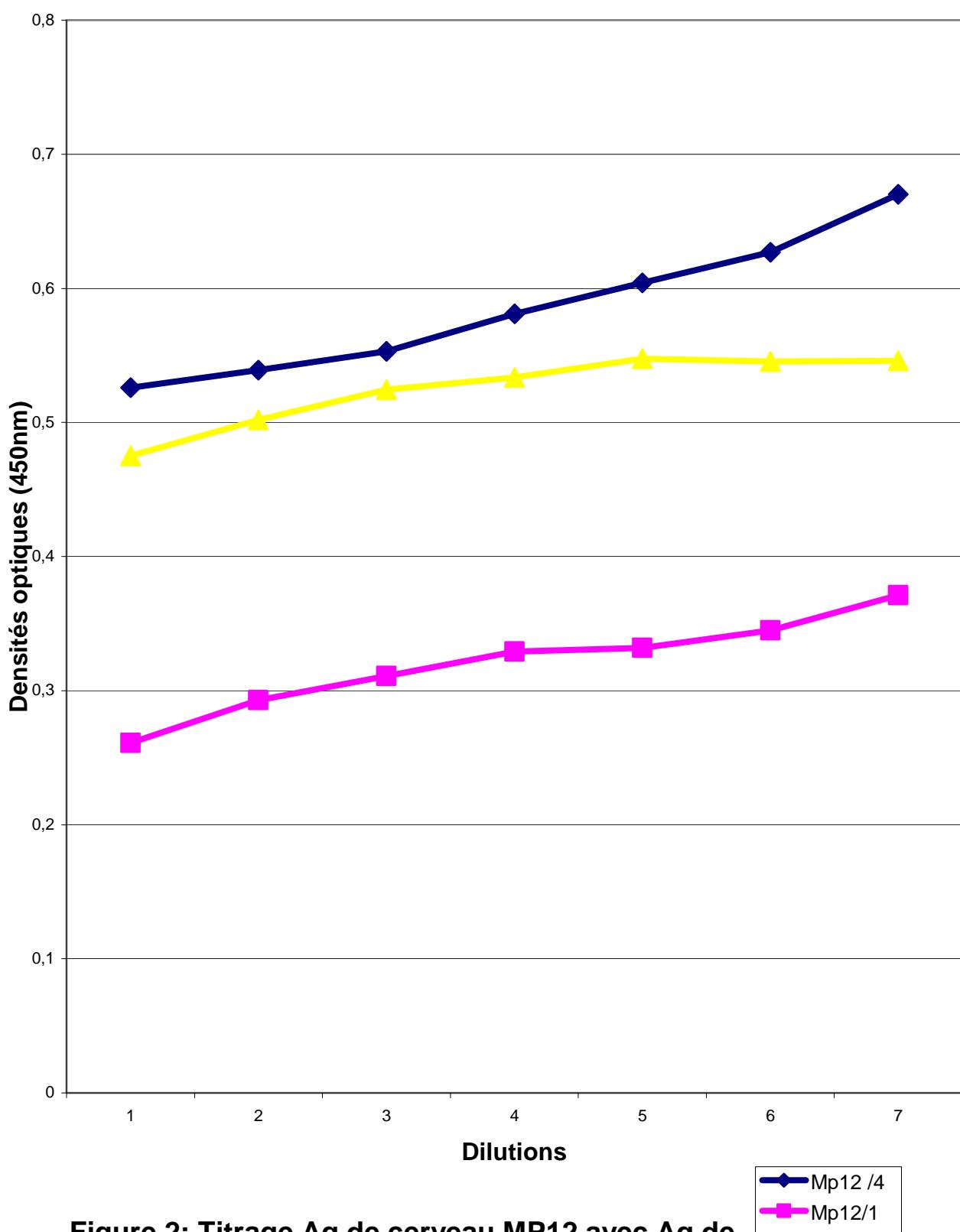


Figure 2: Titrage Ag de cerveau MP12 avec Ag de

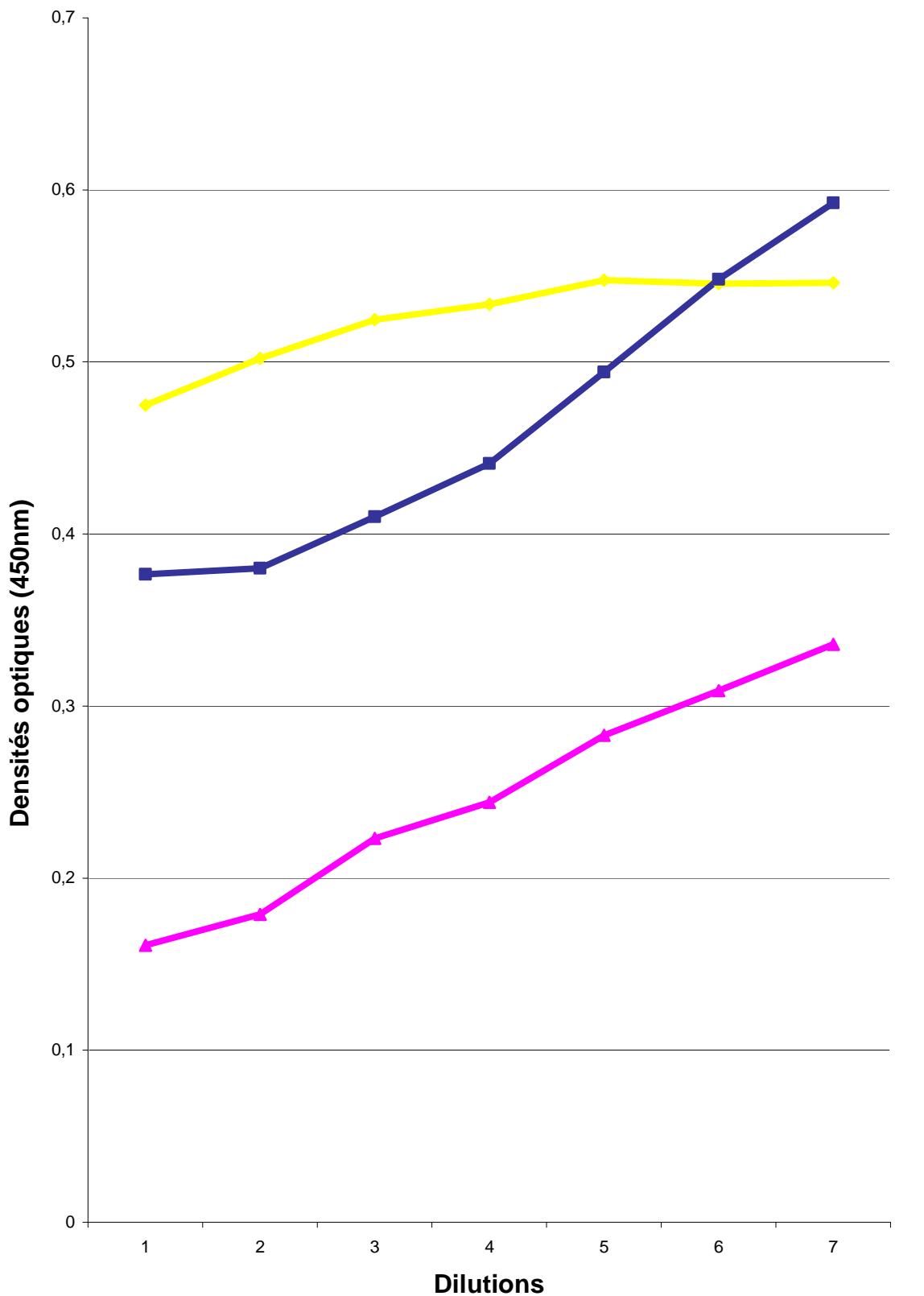


Figure 3: Titrage Ag de cerveau Cl 13 avec Ag de

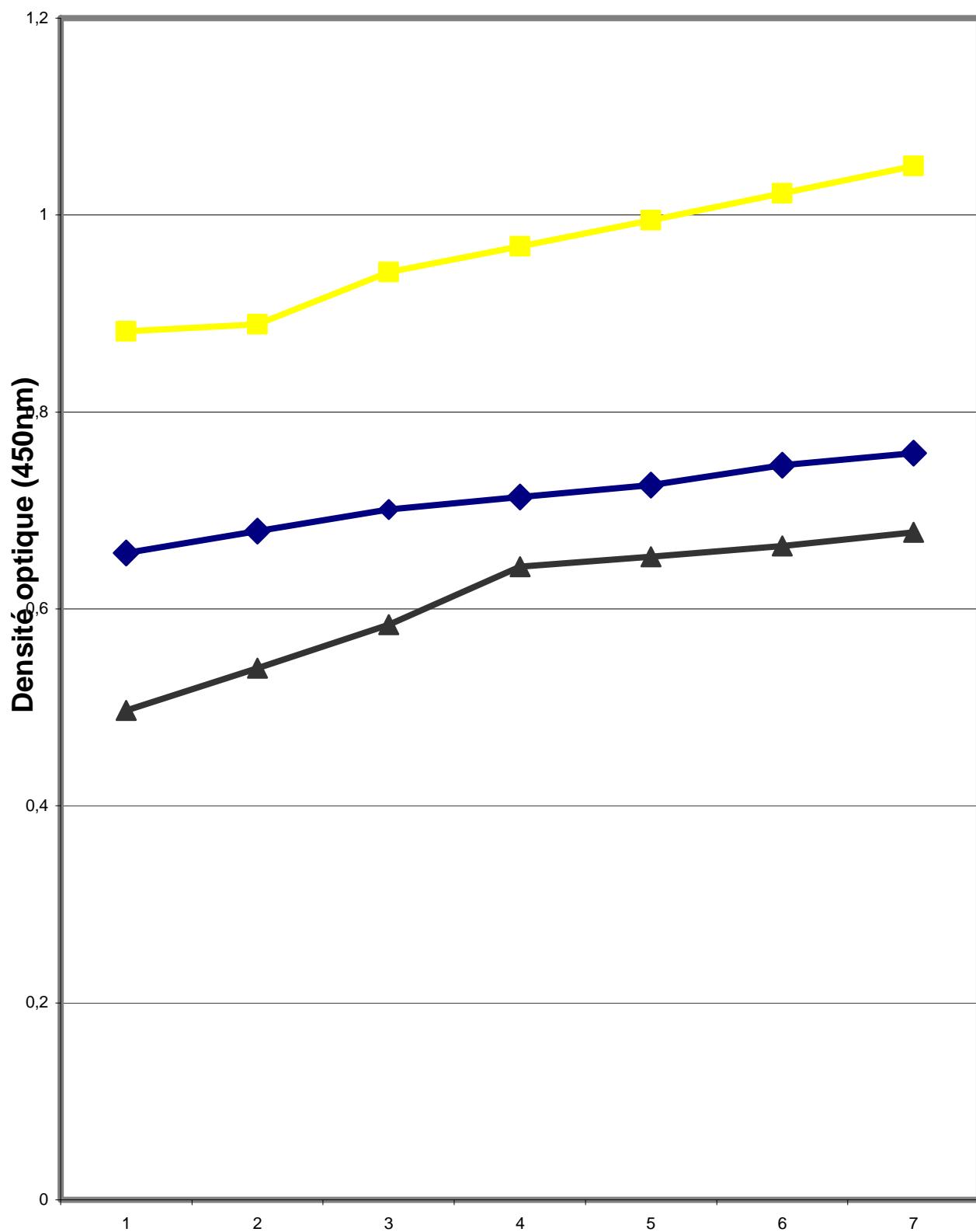
2-Titrage des ascites polyclonaux

Les ascites sont préparés pour servir de témoins dans les tests ELISA. Pour vérifier leur qualité, les ascites des souches CL13 et MP12 sont titrés en comparaison à l'ascite de référence Zinga. La figure 4 montre que les ascites des souches CL13 et MP12 contiennent bien des Ac polyclonaux mais en concentration légèrement moins élevée par rapport à l'ascite de référence.

3- Immunisation

Pour chaque souche virale, un lot de 3 souris est immunisé avec l'Ag cellulaire selon un protocole court avec des injections à 10 jours d'intervalle par voie intra péritonéale. Après quatre injections, une saignée est effectuée, et la réponse polyclonale des souris est testée par ELISA et illustrée sous forme de courbes de titrage.

Pour la souche MP12, c'est la souris n°1 qui a été utilisée pour la fusion puisqu'elle donnait la meilleure réponse. Pour la souche CL13, les souris n°1 et 2 ont été utilisées (voir figures 5 et 6 : réponses polyclonales des souris).



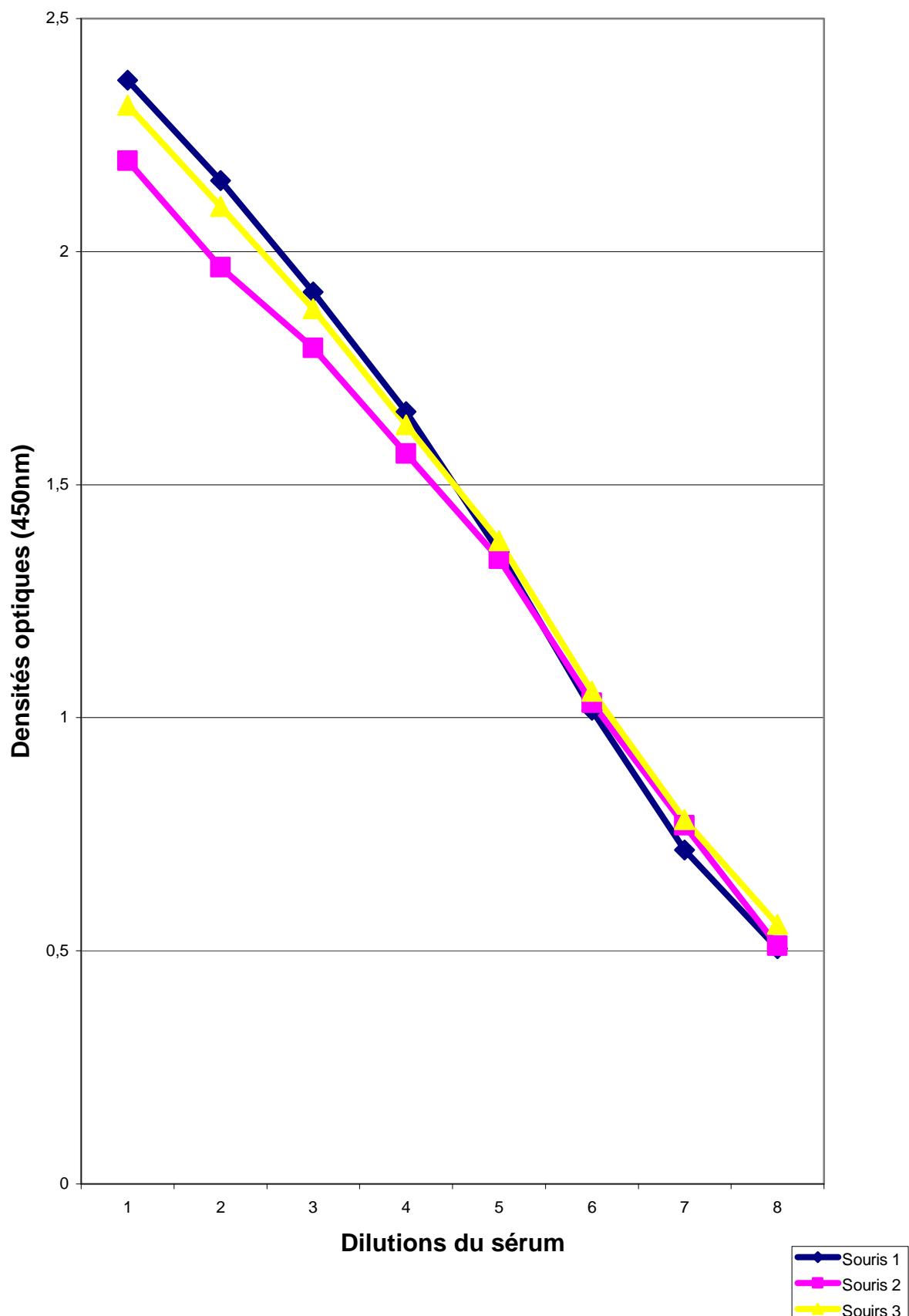


Figure 5: Réponses polyclonales des souris immunisées avec la souche MP12

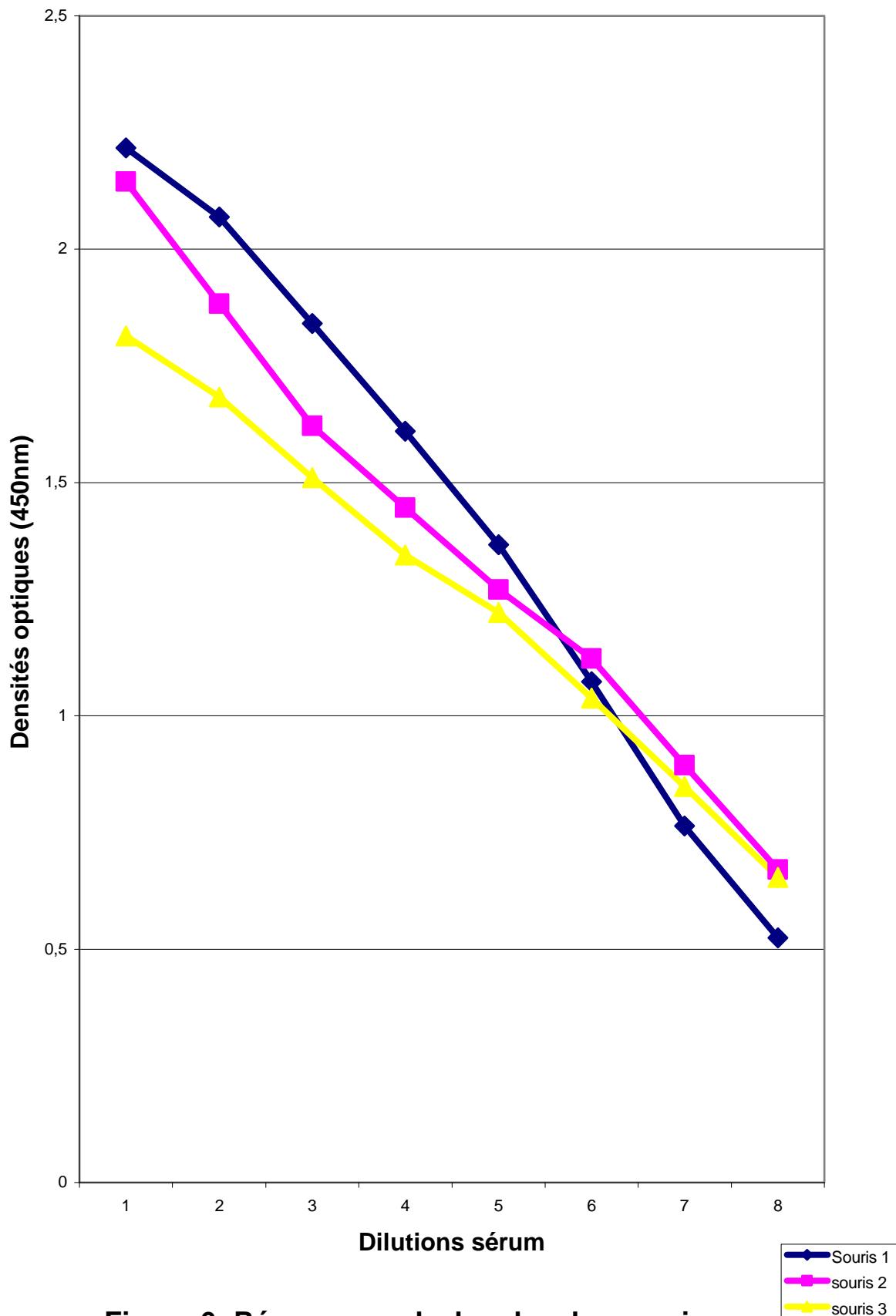


Figure 6: Réponses polyclonales des souris immunisées avec la souche Clone 13

4- Fusion et clonage avec la souche MP12

Après avoir fusionné les lymphocytes B de la souris 1 et les cellules X63, la suspension cellulaire est répartie dans 19 plaques marquées dans un ordre alphabétique de A à S et chaque plaque contient 24 puits. Ce qui fait au total 456 puits mis en culture.

Au bout d'une semaine, le milieu de culture est renouvelé, 15 jours après la fusion, la présence d'hybridomes est vérifiée dans chaque puits et parmi les 456 puits, 132 contenaient effectivement des hybridomes.

Au 18^{ème} jour, un test ELISA est effectué pour chaque puits dans le but de déceler ceux qui contiennent des hybridomes sécréteurs d'Ac spécifiques et 28 puits se sont révélés positifs. Un hybridome est considéré comme positif lorsque sa DO sur l'Ag positif (Ag de cerveau Rift préparé) est supérieure ou égale au double de sa DO sur l'Ag négatif (Ag de cerveau normal).

Ces 28 hybridomes sont maintenus en culture en les faisant passer successivement en plaques de 12 puits, puis en flasques de 25cm². Ils sont ensuite retestés à J22 puis à J31 après la fusion pour contrôler leur stabilité. Ainsi seuls 15 hybridomes ont été retenus comme étant sécréteurs d'Ac contre le VFVR (voir tableau III).

Tableau III : Puits contenant des hybridomes positifs lors de la fusion avec
MP12

Noms des hybridomes	DO sur Ag positif	Double de la DO sur Ag négatif
A16	1,658	0,256
C6	0,405	0,212
D18	0,817	0,244
H6	1,468	0,294
I10	0,412	0,164
F2	0,324	0,234
O20	0,629	0,172
P13	0,937	0,220
Q7	0,401	0,214
Q11	2,152	0,182
Q13	0,476	0,246
Q19	1,436	0,272
R10	2,673	0,216
R9	0,370	0,118
R23	2,233	0,210

Des aliquots de ces hybridomes sont congelés, puis le clonage est effectué par la méthode des dilutions limites.

Le clonage a été fait avec des cellules feeder (splénocytes et macrophages) pour certains hybridomes, mais cela n'a pas donné les résultats escomptés.

Le clonage a été repris et 7 hybridomes ont été clonés. Pour chaque hybridome, une plaque de 96 puits est utilisée et au bout d'une semaine, ces puits sont observés au microscope optique pour détecter ceux qui contiennent des clones.

Dans un intervalle d'un mois, des tests ELISA et des contrôles sont effectués sur ces clones pour sélectionner ceux qui sont positifs.

Après 4 contrôles, nous avons retenu 18 clones qui étaient restés positifs (voir tableau IV).

Tableau IV : Puits contenant des clones positifs lors de la fusion avec MP12

Noms des clones	DO sur Ag positif	Double de la DO sur Ag négatif
R9-1	0,337	0,158
R9-2	0,749	0,174
R23-1	0,720	0,230
R23-3	0,815	0,344
R23-4	0,824	0,244
R23-5	0,994	0,224
R23-8	1,100	0,280
R23-15	0,751	0,268
R23-16	0,815	0,220
R23-17	0,781	0,238
R23-20	0,738	0,298
R23-22	0,781	0,282
R23-30	0,737	0,298
R23-36	0,821	0,230
Q7-1	0,762	0,306

R10-1	0,913	0,216
R10-3	0,756	0,236
R10-5	0,742	0,216

5-Fusion et clonage avec la souche CL13

Une première fusion avec la souris n°1 avait échoué raison pour laquelle l'expérience a été reprise avec la souris n°2.

Une fois les lymphocytes B de la souris n°2 fusionnés avec les cellules X63, la suspension cellulaire est répartie dans 9 plaques numérotées de A à I avec 24 puits dans chaque plaque.

La même procédure de sélection est adoptée pour cette fusion également. Le premier test ELISA pour détecter les hybridomes sécrétateurs d'Ac est effectué 23 jours après la fusion. Puis un contrôle est effectué au 29^{ème} jour et sur les 216 puits mis en culture au départ, seuls 10 contenaient des hybridomes sécrétateurs d'Ac contre le VFVR (voir tableau V).

Tableau V : Puits contenant des hybridomes positifs lors de la fusion avec CL13

Noms des hybridomes	DO sur Ag positif	Double de la DO sur Ag négatif
A7	1,328	0,290
B17	1,788	0,306
B23	0,743	0,708
C3	1,069	0,248

C19	0,789	0,236
D3	1,122	0,244
E24	0,687	0,216
G7	1,413	0,208
G21	0,959	0,210
I1	1,117	0,206

Tous ces hybridomes positifs sont amplifiés en plaque de 12 puits, puis en boîtes de culture de 25cm² et des aliquots sont congelés.

L'étape suivante est le clonage et pour la fusion avec le CL13, 8 hybridomes ont été clonés. Le milieu de culture est additionné d'OPI pour apporter plus de facteurs de croissance aux clones. Au bout de 8 jours après le clonage, les 768 puits sont observés au microscope optique pour détecter ceux qui contiennent des clones.

A la suite du premier test ELISA, 188 clones sont initialement positifs et pendant un mois, des contrôles sont effectués. Après le 3^{ème} test, 37 clones sont restés positifs et parmi eux 26 clones sont retenus et congelés (voir tableau VI).

Tableau VI : Puits contenant des clones positifs lors de la fusion avec CL13

Noms des clones positifs	DO sur Ag positif	Double de la DO sur Ag négatif
A7-4	1,821	0,184
B17-2	1,845	0,238
B23-6	2,429	0,488
B23-18	2,068	0,248
B23-21	2,238	0,362
B23-26	1,688	0,200
B23-28	1,693	0,194
B23-38	1,749	0,200
C19-4	1,989	0,178
G7-6	1,732	0,176
G7-12	1,716	0,202
G7-20	1,737	0,182
G7-22	1,748	0,170
G7-26	1,776	0,170
G7-30	1,715	0,168
G7-37	1,882	0,172

G7-38	1,846	0,440
G7-47	1,655	0,180
G21-1	0,453	0,290
G21-3	0,391	0,270
G21-4	0,366	0,270
G21-6	0,407	0,294
G21-8	0,418	0,338
G21-13	0,343	0,268
I1-13	1,590	0,174
I1-31	1,716	0,184

L'utilisation des AcM comme réactifs constitue une solution aux problèmes de diagnostic de nombreuses affections virales, bactériennes ou parasitaires. Du fait de leur capacité à reconnaître un motif moléculaire particulier, les AcM sont des acteurs dans la détection des molécules.

C'est dans cette optique que nous nous étions fixés pour objectifs dans le cadre de notre étude de décrire la méthodologie de production des AcM et de l'appliquer en vue d'obtenir des AcM dirigés contre les différentes protéines des souches atténuées MP12 et CL13 du virus de la fièvre de la vallée du Rift (VFVR).

Ce phlébovirus de la famille des Bunyavirideae, est très répandu à travers le continent africain où il est une cause majeure de maladie endémique et épidémique pour le bétail. Le virus est responsable de fièvres hémorragiques chez l'homme, d'avortement et de malformations du fœtus chez les ruminants. Des épidémies récentes ont eu lieu en Mauritanie, au Sénégal et la survenue d'une flambée constitue une menace pour des pays en voie de développement comme le nôtre où l'élevage occupe une place importante dans le système économique. Une transmission enzootique du virus existe dans le Nord du Sénégal.

Un programme de surveillance de l'activité du VFVR comportant un suivi clinique et sérologique des animaux vivant dans les zones à risque (vallée du fleuve et du Ferlo) grâce à des troupeaux sentinelles a été mis en œuvre dès la fin de l'épizootie de 1987 par la direction de l'élevage et l'Institut sénégalais de recherche agricole (ISRA) appuyés par le programme de coopération technique de la FAO et le projet EMERCASE (16). L'objectif est de disposer d'un système d'alerte précoce et de réaction rapide vis à vis de la FVR.

Dans le souci de disposer d'anticorps comme réactifs de diagnostic pour une identification spécifique et rapide du VFVR, nous avons préparé des AcM dirigés contre les différentes protéines virales de ses souches atténueées par la méthode d'hybridation cellulaire de Milstein et Köhler (33). Tout l'intérêt de cette méthode réside dans l'obtention d'anticorps homogènes, absolument purs et de spécificité prédéterminée.

Au préalable, nous avons préparé l'Ag de cerveau chez les souriceaux nouveau-nés (SNN) par inoculation intracérébrale. Un minimum de 4 passages a été nécessaire pour obtenir un titre viral acceptable (voir figures 2 et 3). La multiplication des passages est une voie obligatoire pour augmenter la sensibilité de l'Ag.

Un Ag cellulaire a également été produit à partir de cellules VERO par multiplication des passages de même qu'un important stock de virus de travail.

La préparation des ascites polyclonaux a nécessité l'adoption d'un protocole spécifique et a aboutit à des résultats concluants car l'analyse des courbes de titrage montre une légère différence par rapport à l'ascite de référence.

Pour ce qui est de l'application de la technologie de production des AcM, nous avons obtenu un certain nombre de résultats. En effet, la fusion avec la souche MP12 a généré 15 hybridomes et 18 clones positifs, celle avec la souche CL 13 a donné 10 hybridomes et 26 clones sécréteurs.

Certains hybridomes et clones s'étaient négativés du fait de l'instabilité du gé nome hybride.

Le nombre de clones obtenu lors de la fusion avec le CL13 est plus élevé que celui avec la souche MP12. Cela pourrait être en partie aux modifications que nous avons apportées à la composition du milieu de culture pour l'enrichir en facteurs de croissance lors de cette fusion avec le CL 13. Mais il faut dire que la fusion cellulaire est une opération dont la réussite est très aléatoire et dépend de nombreux facteurs difficiles à maîtriser.

En perspective de ce travail, nous envisageons de procéder à la caractérisation des AcM obtenus afin de déterminer leur spécificité, leur classe et sous classe, leurs caractéristiques biochimiques. Ces Ac conjugués à la fluorescéine ou à la peroxydase pourront être utilisés dans les réactions d'IFI ou les tests ELISA pour améliorer leur spécificité, leur sensibilité et faciliter le diagnostic de la FVR.

L'analyse des relations antigéniques entre les différentes souches de VFVR est possible en utilisant des Ac dirigés contre la nucléocapside N. Les AcM spécifiques à la glycoprotéine ont l'avantage supplémentaire de permettre d'examiner des déterminants des protéines d'enveloppe qui sont impliquées dans des fonctions biologiquement importantes telles que la neutralisation et l'hémagglutination.

Il existe de nombreuses autres utilisations de ces AcM, d'où l'intérêt de multiplier et d'approfondir les études dans ce domaine.

La mise au point de la technologie de production des AcM par César Milstein et Georges Köhler a permis de résoudre le problème de l'hétérogénéité des Ac dont l'efficacité dans le diagnostic de certaines affections avait toujours été limitée par leur nature polyclonale. La production d'AcM repose sur le principe de l'hybridation cellulaire. Cette hybridation consiste à fusionner des cellules de plasmocytome murin avec un lymphocyte B stimulé *in vivo* donnant ainsi naissance à une cellule hybride possédant les caractéristiques des deux cellules parentales : le caractère immortel du myélome permettant sa reproductibilité à l'infinie et la capacité de synthèse d'Ac spécifiques dirigés contre un Ag donné, héritée du lymphocyte. Ces hybridomes produisent alors des Ig de spécificité prédéterminée avec des caractéristiques immunochimiques stables : les AcM.

Ainsi, notre étude avait pour objectifs d'une part de décrire cette technologie de production des AcM dans ses différentes étapes, et d'autre part de l'appliquer afin obtenir des AcM dirigés contre les différentes protéines des souches atténuées MP12 et CL13 du VFVR.

Les fusions cellulaires réalisées avec les virus MP12 et Clone 13 ont donné respectivement 18 et 26 AcM dirigés contre les différentes protéines virales, malgré le fait que de nombreux clones se soient négativés.

La caractérisation de ces Ac dans une seconde étape permettra de déterminer leur classe et sous classe, leur spécificité. Nous espérons disposer d'une batterie d'AcM dirigés contre les différentes protéines virales à savoir les glycoprotéines de surface G1 et G2, la nucléoprotéine N, la protéine NSs. Cette caractérisation consistera également à déterminer la capacité des Ac à neutraliser ou non le virus, à déterminer leurs caractéristiques biochimiques par l'étude des épitopes et la mesure de leurs affinités.

L'obtention de tels outils de diagnostic à spécificité fine nous permettra non seulement d'identifier le VFVR de façon ponctuelle, mais aussi de faire la surveillance épidémiologique du virus aussi bien chez les animaux que chez l'homme, et de pouvoir déterminer l'origine géographique des différentes souches de VFVR responsables d'épidémies.

Bibliographie

1. Ahlstedt S, Bjorksten B.

Specific Antibody response in rats and mice after daily immunization without adjuvant

Int Arch Allergy Appl Immuno, 1983, 171: 293-299.

2. Atassi M Z .

Preparation of monoclonal antibodies to preselected protein regions

Methods Enzymol, 1986, 121: 69-95.

3. Bernard J, Ittelet D.

Les anticorps monoclonaux et leurs applications

Le technicien Biologiste, 1983, 9: n°3, 119-122.

4. Besler W G , Hauschmidt S.

Bakterielle lipopeptide als immunadjuvantien.

Forum Mikrobiol, 1987, 4: 106 – 111.

5. Billecoq A, Vialat P, Bouloy M.

Persistent infection of mammalian cells by Rift Valley fever virus,

Journal of General Virology, 1996, 77: 3053-3062.

6. Billecocq A, Vazeille-Falcoz M, Rodhain F, Bouloy M.

Pathogen-specific resistance to Rift Valley fever virus infection is induced in mosquito cells by expression of the recombinant nucleoprotein but not NSs non-
structural protein sequences

Journal of General Virology, 2000, 81: 2161-6.

7. CDC- Disease informaton.

Viral hemorrhagic fevers: Fact Sheets

Doc : CDC

site web: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/rvf.htm>

8. Collet M, Kakach L, Suzich J A, Collet M S.

Rift Valley fever virus M segment: phlebovirus expression strategy and protein glycosylation

Virol, 1989, 170: 505-510.

9. Collett M S, Purchio A F, Keegan K, Frazier S, Hays W, Anderson D K, Parker M D, Schmaljohn C, Schmidt J, Dalrymple J M.

Complete nucleotide sequence of the mRNA segment of Rift Valley fever virus
Virology , 1985, 144: 228- 245.

10. Daubney R, Hudson J R.

Enzootic hépatits in Rift Valley ferver: An undescribed virus disease of sheep, cattle and man from East Africa with an account of experimental inoculation of man

J.Path, 1931, 34: 545-579.

11. Davies F G, Linthicom K J, James A D.

Rainfall and epizootic Rift Valley fever

Bull Word Health Organ, 1985, 63: 941-943.

12. Desmyster J, Melnick J L, Rawls W S.

Defensiveness of interferon production and rubella virus interference in a line of African Monkey kidney cell (vero).

J. Virol, 1968, 2 : 955-961.

13. Dictionnaire-Frame générale

Lymphocyte

Les éditions de l'Analogie, 2001, p 1.

Site web : http://www.sciences-en-ligne.com/Frames_dictionary.asp

14. Diop G, Jocelyn T, Didier F, Diallo M, Sall A, Ruel T D, Gonzalez J P.

The potential rôle of rodents in the enzootic cycle of Rift Valley fever virus in Senegal

Microbes and infection, 2000, 4: 1-4.

15. Elliot R M.

Molecular biology of the Bunyaviridae

Journal of General Virology, 1990, 71: 501-522 .

16. FAO

Actes du séminaire sur la surveillance épidémiologique et le contrôle de la fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Ouest (Mali-Mauritanie-Sénégal)

Doc : FAO, TCP/RAF/8931

Dakar, Sénégal 9-12 avril 2001.

17. Farber D.

Hybridoma Technology in the Biosciences and Medecine.

Edited by Timothy A Springer, Plenum Press, 1985, p 602.

18. Fazekas de St.Groth S, Scheidegger D.

Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics

J Immunol.Meth, 1980, 35: 1-24.

19. Fontenille D, Traore M, Lamizana, Thonnon J, Digoutte J P, Zeller H G.

Nouveaux vecteurs de la fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Ouest
Emerging infectious diseases, 1998, 4 (2): 1-6.

20. Galfré G, Milstein C, and Wright B.

Rat x rat Hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG
Nature, 1979, 277: 131-133.

21. Galfré G, Milstein C.

Préparation of monoclonal antibodies: strategies and procédures
Meth.enzymol, 1981, 73: 3-46.

22. Giorgi C, Acardi L, Nicoletti L, Gro M C, Takehara K, Hildich C, Morikawa S, Bishop D H L.

Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian sandfly fever and Uukuniemi viruses

Virol, 1991, 180: 733-753.

23. Girard M, Hirth L.

Virologie moléculaire
Doin Editeur, Paris, 1989, p 101.

24. Goding JW.

Monoclonal Antibodies : principles and practice.
Academic Press, London, 1983.

25. Hachette Multimedia. Encyclopedie.

Les hybridomes

Données encyclopédiques, copyright c 2001

Site web : http://fr.encyclopedia.yahoo.com/articles/ne/ne_0024_p0.html

26. Harlow E, Lane D

Antibodies A Laboratory Manual

Cold Spring Harbor Laboratory , 1988, p219-223.

27. Hengartner H, Luzzati A, Ceppelini R.

Monoclonal Antibodies against human lymphocyte antigens

Nature, 1978, 273: 666-668.

28. Hu J G, Yokoyama T, Kitagawa T.

Studies on the optimal immunization schedule of experimental animals .I.V The optimal age and sexe of mice, and influence of booster injections

Chem Pharm Bull, 1990, 38: 448-451.

29. Hu JG , Kitagawa T.

Studies on the optimal immunization of experimental animals . V I. Antigen dose – response of aluminium antigen dose .

Chem Pharm Bull, 1990, 38 : 2775 –2779.

30. Kearney J F, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K.

A new mouse myeloma cell line which has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting hybrid cell lines

J. Immunol, 1979, 123:1548-1550.

31. Kilmartin J V, Wright B, Milstein C.

Rat monoclonal antitubulin antibodies derived by using a new nonsecreting rat cell line

J. Cell. Biol, 1982, 93: 576-582.

32. Köhler G, Milstein C.

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity
Nature 1975, 256: 495-497.

33. Köhler G, Milstein C.

Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion

Eur, J. Immunol, 1976, 6: 511-519.

34. Laughlin L W, Meegan J M, Stransbaugh L J, Morens D M, Watten R H.

Epidemic Rift Valley fever in Egypt: Observations of the septum of human illness

Trans.Soc.Trop.Med.Hyg, 1979, 73: 630-633.

35. Lerhardt W, Anderson J, Coutinho A, Melchers F.

Cloning of murine transformed cell lines in suspension culture with efficiencies near 100 %

Exp. Cell Res, 1978, 111: 309-316.

36. Linthicum K J, Davies F G, Kairo A, Bailey C L.

Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus Phlebovirus) isolation from Diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya
J. Hyg. Camb, 1985, 95(1): 197-209.

37. Margulies D H, Kuehl W M, Scharff M D.

Somatic cell hybridization of mouse myeloma cells
Cell, 1976, 8: 405-415.

38. Meegan J M.

The Rift Valley fever epizootic in Egypt at 1977-78. Description of the epizootic and virological studies
Trans.Roy.Soc. Trop. Med. Hyg, 1975, p73,618.

39. Meegan J M, Bailey C H.

Rift Valley fever
In:Monath TP.editor. The arboviruses: Epidemiology and Ecology IV,CRC Press Inc,
Boca Raton.FI 1989, p.51-76 .

40. Müller R, Argentini C, Bouloy M, Prehaud C, Bishop D H L.

Completion of the genome sequence of Rift Valley fever phlebovirus indicates that the L RNA is negative sense or ambisense and codes for a putative transcriptase-replicase

Nucl. Acids Res, 1991, 19: 5433.

41. Niklasson B, Peters C J, Gradien M, Wood O.

Detection of human immunoglobulins G and M antibodies to Rift Valley fever virus by enzyme-linked immunosorbent assay
J Clin Microbiol, 1989, 19: 225-229.

42. Oi V T, Herzenberg L A.

Immunoglobulin producing hybridoma cell lines
Eds, Freeman, San Fransisco, 1980, pp 351-372.

43. Palfreyman J W, Aitcheson T C, Taylor P.

Guidelines for the production of polypeptide specific antisera using small synthetic oligopeptides as immunogens
J Immunol Methods, 1984, 75: 383 – 393.

44. Parks D R, Bryan V M, Oi V T, Herzenberg L A.

Antigen specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence activated cell sorter
Proc.Natl . Acad.sci. USA, 1979, 76: 1962 –1966.

45. Pessi A.

Multiple antigens peptids (MAPS): a step further towards synthetic peptide vaccines
Chimicaoggi, 1991, 9(1-2): 51 – 56.

46. Peter C J, Linthicom K J.

Rift Valley fever
In: Beran G W, editor. CRC handbook series in zoonoses, section B: viral zoonoses. 2nd ed. Boca Raton (FL) : CRC Press Inc, 1994, p.125-138.

47. Peters C J.

Emerging of Rift Valley fever
In : Saluzzo J F, Dodet B, editors. Factors in the emergence of arbovirus disease Elsvier, Paris, 1997, p.253-264.

48. Peters J H, Baumgarten H

Monoclonal Antibodies

Principles of cell Hybridization

Plenum Press, New York, 1985, p 13.

49. Rahim I H, Hakim A E U, Hussein M.

An epizootie of Rift Valley fever in Egypt in 1997

Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 1999, 18(3): 741-748.

50. Rathjen D A, Undewood P A, Whalley J M.

An evaluation of some *in vivo* immunization strategies for the production of monoclonal antibodies to insulin and ACTH

J Biol Stand, 1986, 14: 1-14.

51. Raymond Y, Suh M.

Lymph node primary immunization of mice for the production of polyclonal antibodies

J Immunol Methods, 1986, 93: 103-106.

52. Sall A A, Zanotto P M, Sene O K, Zeller H G, Digoutte J P, Thiongane Y, Bouloy M.

Genetic reassortment of Rift Valley fever virus in nature

J Virol, 1999, 73 (10): 81-96-200.

53. Saluzzo J F, Anderson G W, Hodgson Jr L A, Digoutte J P, Smith J F.

Antigenic and biological properties of Rift Valley fever virus isolated during the 1987 Mauritanian epidemic

Research in Virology, 1989, 140(2): 155-164.

54. Sela M, Armon R.

From synthetic polypeptides to synthetic vaccines antigen structure and function
CRC Press, Boca Raton , 1987, 6–12.

55. Shulman M, Wilde C D, Köhler G.

A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies
Nature, 1978, 276: 269-270.

56. Spitz M, Spitz L, Thorpe R, Eugui E.

Intrasplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies
J Immunol Methods, 1984, 70: 39-43.

57. Taggart R T, Samloff I M.

Stable antibody producing murine hybridomas
Science, 1983, 219: 1228-1233.

58. Thiongane Y, Zeller H, Lo M M, Fati N A, Akakpo J A, Gonzalez J P.

Baisse de l'immunité naturelle vis-à-vis de la fièvre de la Valley du Rift chez les ruminants domestiques du bassin versant du fleuve Sénégal après l'épidémie de 1987

Bulletin de la société de Pathologie Exotique, 1994, 87: 5-6.

59. Thiongane Y, Gonzalez J P, Fati A, Akakpo J A.

Changes in Rift Valley fever neutralizing antibody prevalence among small domestic ruminants following the 1987 outbreak in the Senegal river basin
Research in Virology, 1997, 78 (6) : 1349-1352.

60. Thonnon J.

RVF surveillance in lower Senegal basin update 10 years after the epidemic
Trop. Med. Int. Health, 1999, 4(8): 580-585.

61. Trowbridge I S.

Interspecies spleen myeloma hybrid producing antibodies against mouse
lymphocyte surface glycoprotein T 200
J. Exp. Med. 148: 313-323.

62. WHO.

Rift Valley fever in Saoudi Arabia
Disease Outbreaks Reported, 2000.
Doc : WHO, site web: WHO Fact Sheet on Rift Valley fever

**63. Zeller H G, Bessin R, Thiongane Y, Bapetel I, Teouk Gbaguidi Ala M,
Nde Atse A, Sylla R, Digoutte J P, Akakpo J A.**

Rift Valley fever antibody prevalence in domestic ungulates in several outbreak
Res Virol, 1995, 146: 81-85.

