

Etude de la spécificité d'anticorps monoclonaux obtenus avec la souche de virus de rage Pasteur PV

G. LIBEAU (1), M. LAFON (2) et P. E. ROLLIN (2)

(1) I.E.M.V.T. 10, rue Pierre-Curie, 94704 Maisons-Alfort Cedex.

(2) Institut Pasteur, Unité de la Rage, 25, rue du Dr.-Roux, 75724 Paris Cedex 15.

RÉSUMÉ

LIBEAU (G.), LAFON (M.), ROLLIN (P. E.). — Etude de la spécificité d'anticorps monoclonaux obtenus avec la souche de virus de rage Pasteur PV. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1984, 37, (4) : 383-394.

Des anticorps monoclonaux obtenus avec la souche de virus de rage fixe PV ont été caractérisés au regard de leur réactivité avec les structures de la nucléocapside ou de la glycoprotéine membranaire de différentes souches rabiques ou de souches apparentées à la rage. Les auteurs insistent sur l'importance pratique de tels anticorps monoclonaux dans le diagnostic de routine.

Mots-clés : Rage - Anticorps monoclonaux.

SUMMARY

LIBEAU (G.), LAFON (M.), ROLLIN (P. E.). — Characterization of monoclonal antibodies against Pasteur rabies virus strain. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1984, 37, (4) : 383-394.

Monoclonal antibodies against the fixed rabies virus strain (PV) have been characterized according to their reactivity with the nucleocapsid or the membrane glycoprotein of different rabies and rabies-related strains (Mokola, Lagos-bat and Duvenhage).

Among the anti-nucleocapsid antibodies, two react exclusively with the rabies strains, whereas the others, beside their reactivity with the rabies strains, reveal differences among the rabies-related group.

Among the anti-glycoprotein antibodies, four can neutralize *in vitro* the infectivity of the rabies strains and can also neutralize one rabies-related Mokola strain ; only one neutralize the rabies strains exclusively.

These monoclonal antibodies might be included into a panel of monoclonal antibodies for the identification of the rabies and rabies-related viruses.

Key words : Rabies - Monoclonal antibodies.

INTRODUCTION

Le virus rabique appartient, au sein des rhabdovirus, au groupe des Lyssavirus. Ce groupe inclut également trois virus apparentés à la rage : Lagos-bat, Mokola et Duvenhage (25). Le virus de la rage et les virus apparentés sont constitués de deux antigènes majeurs : la glycoprotéine de surface et la nucléocapside interne (21). Seule la glycoprotéine induit la formation d'anticorps neutralisants (26). Aujourd'hui, le diagnostic d'une infection par

le virus rabique ou par les virus apparentés est réalisé sur cultures cellulaires ou sur impressions de cerveaux. Ce diagnostic utilise un sérum polyclonal conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine et préparé à partir de nucléocapsides prélevées sur des cellules infectées par une souche de virus de rage. Cette méthode, rapide et fiable, ne permet toutefois pas de distinguer une infection causée par le virus rabique d'une infection causée par un virus apparenté car d'importantes réactions sérologiques croisées existent entre ces deux virus au niveau de la nucléocapside.

Nous avons donc cherché à améliorer la puissance du diagnostic en sélectionnant des anticorps spécifiques des Lyssavirus, du virus rabique ou de chacun des virus apparentés.

Nous présentons ici les étapes de sélection et de caractérisation des anticorps monoclonaux obtenus à l'aide de souris Balb/c immunisées avec la souche de virus de rage Pasteur (PV).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. SOUCHES VIRALES

— Souches PV

PV/BHK : elle dérive de la souche Pasteur (PV) isolée en 1882 et entretenue depuis par passages intracérébraux de lapin à lapin. Après avoir été entretenue aux Etats-Unis, cette souche est revenue à l'Institut Pasteur en 1965 (15). Elle a alors été adaptée à la culture de cellules BHK-21 et appelée PV/BHK.

PV/RV 31 : cette souche de virus vaccinal est issue de la souche PV après adaptation sur cellules de premier explant de rein de fœtus bovin (3). Elle est actuellement utilisée pour produire un vaccin à usage humain. Le vaccin lyophilisé est présenté en dose de 1 ml. Le lot utilisé dans cette étude a un titre de $10^{6.5}$ UFP/ml (lot 004). La quantité de protéine totale est supérieure ou égale à 50 µg/ml et les protéines d'origine bovine sont comprises entre 0,3 et 1 µg/ml. Le vaccin est distribué par l'Institut Pasteur Production (I.P.P.).

— Autres souches de virus fixes

ERA : cette souche rabique atténuée a été isolée en 1935 à partir d'un chien puis adaptée à la culture cellulaire sur rein de porc et finalement passée sur cerveaux de souris et sur cellules de rein de hamster (1). Elle est conservée et utilisée par les Laboratoires Connaught (Ontario, Canada).

CVS (Challenge Virus Standard) : issue de la souche Pasteur, cette souche virale a été entretenue par passages successifs sur cerveaux de souris puis adaptée à la culture de cellules (11). La souche utilisée ici provient de l'Institut Wistar (Philadelphie, USA).

— Souches des rues

Ce sont des souches d'origine humaine ou animale, conservées par le Centre Collaborateur OMS de l'Institut Pasteur. L'étude par immunofluorescence est réalisée sur calques,

soit à partir du cerveau original, soit à partir de cerveaux de souris après 1 ou 2 passages.

— Souches de virus apparentés

Mokola : la première souche provient d'une musaraigne capturée au Cameroun (14). La deuxième souche a été isolée en 1981 à partir d'un rongeur insectivore en République Centrafricaine (19) et adaptée à la culture cellulaire sur cellules BHK-21 après 6 passages.

Lagos-bat : une souche est originaire de Lagos (Nigéria) ; elle a été isolée en 1956 à partir d'une chauve-souris (4). L'autre souche a été isolée à partir des organes de *Micropterus pusillus* en République Centrafricaine (22).

Duvenhage : cette souche provient d'Afrique du Sud où elle a été isolée à partir d'un cerveau humain (23).

2. PROPAGATION ET PURIFICATION DU VIRUS

Le virus PV est propagé sur cellules BHK-21 et purifié selon la technique décrite par WIKTOR *et al.* (24). Le culot viral repris dans du tampon NTE (20), est utilisé pour le rappel des souris dont les cellules spléniques serviront à la fusion. La teneur en protéines des échantillons est déterminée par la méthode de LOWRY *et al.* (17).

3. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Des souris consanguines Balb/c femelles, âgées d'un mois reçoivent par voie intrapéritonéale (ip) une primo-injection d'une dose de vaccin PV/RV 31 inactivé par la β -propionolactone. Elles reçoivent un rappel par voie intraveineuse (iv) de virus vivant PV/BHK purifié et concentré (25 µg/souris). Le rappel a lieu au 7^e ou 72^e jour qui suit la primovaccination et les souris sont sacrifiées trois jours après. Les méthodes utilisées pour la fusion et la culture des hybridomes sont décrites de façon détaillée par LIBEAU et LAFON (16).

Brièvement, la fusion est réalisée avec un culot de cellules contenant $3,5 \times 10^8$ splénocytes et $3,5 \times 10^7$ myélomes sp2/0 et 0,5 ml de PEG 45 p. 100 (Merck, mw 1 500), puis 0,5 ml de PEG 25 p. 100. La suspension cellulaire est mise en culture dans du DMEM conditionné (50 p. 100 de surnageant de myélome)

pendant 24 heures, puis dans du milieu HAT (milieu DMEM additionné d'hypoxanthine 10^{-4} M, d'aminoptérine 4×10^{-7} M et de thymidine $1,6 \times 10^{-5}$ M). Les colonies cellulaires ayant résisté à ce milieu sélectif sont testées pour détecter la présence dans le surnageant de culture d'anticorps spécifiques de la souche rabique PV en utilisant un test immunoenzymatique.

Les colonies d'hybridomes sécréteurs sont clonées par dilution limite sur tapis de cellules nourricières (macrophages ou thymocytes). Pour chaque colonie productrice d'anticorps spécifiques, 2 ou 4 clones sont retenus, cultivés *in vitro* pour l'obtention de surnageants cellulaires riches en anticorps, ou injectés par voie intrapéritonéale à des souris Balb/c ayant préalablement reçu 0,5 ml de pristane (2, 6, 10, 14 tétraméthylpentadécane, Jansen Pharmaceutica, réf. T 2280.2) pour la production d'ascites.

4. SPÉCIFICITÉ ET TITRE DES ANTICORPS MONOCLONAUX DÉTERMINÉS PAR TEST IMMUNOENZYMATIQUE (TIE)

4.1. Spécificité des anticorps monoclonaux

Les anticorps sont testés par test immunoenzymatique (TIE) pour leur capacité à se lier au virus rabique PV fixé dans des cupules de plaques de polystyrène. Des plaques préalablement sensibilisées par le virus PV/BHK (EIA rage IPP, lot 008, réf. 72126) sont utilisées ; elles sont lavées 4 fois avec du tampon phosphate 0.05 p. 100 Tween 20, pH 7.0 (PBS/Tween). Deux cent cinquante μ l d'anticorps dilués dans du PBS/Tween/0,5 p. 100 de sérum albumine bovine (BSA) sont incubés une heure à 37 °C dans une étuve humide. Après 4 lavages en PBS/Tween, 250 μ l par cupule d'anticorps anti-Ig de souris couplés à la peroxydase (Po) (2) sont mis en contact une heure à 37 °C. Ces conjugués sont soit des sérums de lapin anti-IgG (H + L)-Po de souris, soit des sérums de chèvre anti-IgM (Fc)-Po de souris (Nordic Immunology). Après une dernière série de lavages en PBS/Tween, 250 μ l par cupule de substrat enzymatique sont mis à incuber à l'obscurité, pendant une demi-heure à température ambiante. L'eau oxygénée H2O2 catalyse la réaction d'oxydation de l'orthophénylène diamine OPD (0,4 mg/ml, couleur

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

La caractérisation de l'isotype d'un anticorps monoclonal utilise le TIE décrit précédemment avec la modification suivante. Les anticorps sont mis en contact avec 200 μ l d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG1 (1/2000), anti-IgG2a (1/2000), anti-IgG2b (1/8000), anti-IgG3 (1/8000) et anti-Ig (1/4000)/(Nordic Immunology). L'incubation est d'une heure à 37 °C. Enfin l'addition de 200 μ l d'un conjugué peroxydase anti-IgG (H + L) de chèvre préparé chez le lapin, dilué au 1/4000 permet de révéler l'isotype de l'anticorps monoclonal.

4.2. Titre des anticorps monoclonaux

Le titre des anticorps monoclonaux est déduit de l'intensité de la réaction de quantités variables d'anticorps obtenue avec une quantité fixe de virus en TIE. Les modifications suivantes sont introduites : les surnageants d'hybridomes sont dilués de 3 en 3 à partir du 1/3 jusqu'à 1/6561, tandis que les ascites sont diluées de 3 en 3 à partir d'une dilution au 1/100 jusqu'au 1/218700. Le volume final de chaque cupule est de 200 μ l.

5. SPÉCIFICITÉ ET TITRE DES ANTICORPS MONOCLONAUX DÉTERMINÉS PAR TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI)

La détermination de la spécificité antinucléocapside (anti-NC) ou antiglycoprotéine (anti-G) des anticorps monoclonaux, l'évaluation de leur titre ainsi que leur aptitude à neutraliser *in vitro* le virus utilisent une micro-méthode en plaques de culture de type Terasaki (Falcon, N° 3034) dérivée des techniques décrites par KOPROWSKI et WIKTOR (12).

5.1. Titre du virus déterminé par test d'immunofluorescence

Le virus est dilué de 10 en 10 dans du milieu essentiel minimal contenant 10 p. 100 de sérum

de veau foetal (MEM 10) en plaques de culture à 96 puits (Falcon, N° 3072) et mélangé à une suspension de cellules BHK-21 (10^6 cellules/ml). Les cellules infectées sont immédiatement transférées dans des plaques de culture de type Terasaki (10 μ l/cupule) et incubées 24, 48 ou 72 heures à 37 °C (5 p. 100 de CO₂) avant fixation et coloration. Le titre du virus est représenté par l'inverse de la plus forte dilution donnant 50 p. 100 de cellules infectées.

5.2. Tests d'immunofluorescence indirecte

— Sur cellules infectées et fixées à l'acétone : le test mis au point par COONS et KAPLAN (5) permet de distinguer les anticorps à spécificité anti-NG (fluorescence en amas cytoplasmiques) et les anticorps à spécificité anti-G (fluorescence de membrane). Une suspension de cellules BHK-21 infectées par une dilution virale permettant d'obtenir 80 p. 100 de cellules infectées en 24 ou 48 heures est distribuée à raison de 10 μ l par cupule sur une plaque de culture de type Terasaki. Après incubation, les plaques sont lavées au PBS et fixées 30 min par un mélange acétone-eau (80-20). Dix microlitres d'anticorps à la dilution de travail (recherche de la spécificité des hybridomes) ou à des dilutions de raison 3 (1/100 à 1/24300 pour le titrage des liquides d'ascites) sont incubés 30 min à l'étuve humide. Après deux lavages au PBS, 10 μ l de globulines de lapin anti-IgG de souris couplées à la fluorescéine (IPP, N° 74641) et diluées au 1/40 sont ajoutés et incubés 30 min. L'addition, au conjugué fluorescent, de bleu Evans (dilué au 1/20000) facilite la lecture au microscope à fluorescence (Zeiss épifluorescence).

— Sur impressions de cerveaux : la méthode des calques de cerveaux infectés (10) est utilisée pour l'étude rapide du profil antigénique des souches de rage des rues et des souches de virus apparentés à l'aide des anticorps anti-NC et suit les mêmes étapes que celles décrites ci-dessus.

6. TEST DE NEUTRALISATION

La technique utilisée est adaptée de celle décrite par WIKTOR et KOPROWSKI (27). Le virus est dilué de 10 en 10 dans du milieu MEM 10. Cinquante microlitres de chaque dilution sont répartis dans une plaque de 96 puits contenant déjà 50 μ l d'anticorps

monoclonal. Après une heure d'incubation à 37 °C, 50 μ l d'une suspension de cellules BHK-21 à 10^6 cellules par ml sont ajoutés à chaque cupule. Après mélange, 10 μ l de chaque cupule sont transférés dans une cupule de plaque de culture Terasaki. Enfin, après 3 jours d'incubation à 37 °C (5 p. 100 de CO₂) les plaques sont fixées à l'acétone (80-20) et les cellules infectées sont mises en évidence par un sérum de lapin anti-NC rabique couplé à la fluorescéine et dilué au 1/40 (IPP, N° 72114).

Les titres du virus incubé en présence ou en absence des anticorps sont déterminés. L'index de neutralisation est calculé en faisant la différence entre les logarithmes décimaux des deux titres. Un index de neutralisation supérieur à 2,5 indique que l'anticorps est neutralisant. Au contraire, un index de neutralisation inférieur à 2,5 indique que l'anticorps n'est pas neutralisant.

RÉSULTATS

1. SÉLECTION DES HYBRIDOMES SÉCRÉTEURS ET CARACTÉRISATION DES ISOTYPES

Le test immunoenzymatique a été utilisé pour la sélection des colonies d'hybridomes sécréteurs, et pour la caractérisation des classes et des sous-classes (isotypes) d'immunoglobulines produites. Ce test a été retenu pour sa rapidité d'exécution (les plaques sont déjà tapissées de virus complet homologue) et pour sa sensibilité (le volume testé est faible et peut donc correspondre au surnageant d'une colonie naissante).

Le sérum de lapin anti-IgG ou le sérum de chèvre anti-IgM de souris couplés à la peroxydase ont été préférés au conjugué protéine A-Po. Ce conjugué ne reconnaît pas, dans les conditions de pH utilisées, certains isotypes de souris, comme μ , γ 1 et α (7). L'emploi des deux sérums anti-IgG et anti-IgM constitue de plus une étape préliminaire à la caractérisation des isotypes. Aucune colonie sécrétant à la fois des immunoglobulines de classe M et des immunoglobulines de classe G n'a été observée. Les colonies ont conservé au cours de leur développement la spécificité de l'immunoglobuline initiale. La colonie est considérée comme non sécrétrice si la Do est inférieure à 0,200. La colonie est au contraire productrice d'anticorps spécifiques pour le virus de la rage si la DO obtenue est supérieure à 0,200 et la culture de la colonie est poursuivie.

Les résultats obtenus sont significativement supérieurs ou inférieurs à cette valeur.

Treize hybridomes sécrétant des anticorps spécifiques de la souche rabique PV ont été sélectionnés ; sur l'ensemble des colonies ayant résisté au milieu sélectif, 45 p. 100 sont non spécifiques de la souche PV. Certaines colonies, comme PVD, présentent avec l'antigène une faible réactivité qui s'est maintenue même après l'isolement de sous-colonies

(Tabl. I). Ce comportement doit correspondre à une faible affinité de l'anticorps pour l'antigène viral.

Afin d'identifier facilement la souche virale (PV) utilisée pour produire les anticorps monoclonaux, la nomenclature retenue pour les hybridomes et les anticorps qu'ils produisent est la suivante : PVA, PVB, PVC... et pour les clones : PVA1, PVA2, PVA3...

Lorsqu'un même comportement est observé

TABLEAU N°1-Hybridomes positifs sélectionnés par TIE.
Isotypes et titres

	DO*	Isotype	Titre	
			Surnageant	Ascite
PVA1	1134	γ 1	2187	218700
PVA2	1302	γ 1	2187	218700
PVA3	1402	γ 1	2187	218700
PVA5	1244	γ 1	729	218700
PVB1	1112	γ 1	2187	21800
PVB8	1097	γ 1	729	NT
PVC3	1549	γ 2a	81	NT
PVC4	1561	γ 2a	81	NT
PVC6	1417	γ 2a	81	NT
PVD1	303	γ 1	27	8100
PVD3	75	γ 1	27	8100
PVD9	159	γ 1	27	8100
PVE3	2000	γ 2a	2187	218700
PVE7	2000	γ 2a	2187	218700
PVE8	2000	γ 2a	2187	218700
PVE11	1758	γ 2a	2187	218700
PVF5	865	γ 2a	729	218700
PVF8	814	γ 2a	729	218700
PVF9	901	γ 2a	729	NT
PVG4	814	γ 3	2187	72900
PVG14	750	γ 3	729	8100
PVI 5	710	γ 2a	243	72900
PVI 9	719	γ 2a	27	72900
PVI 12	868	γ 2a	243	218700
PVO3	1118	μ	243	72900
PVO4	1493	μ	243	NT
PVO12	1512	μ	243	72900
PVP20	870	μ	27	NT
PVP21	2000	μ	27	900
PVP22	2000	μ	9	NT
PVQ16	931	γ 2b	81	24300
PVQ18	914	γ 2b	243	2430
PVQ19	802	γ 2b	27	900

(* DO = densité optique obtenue en TIE avec le surnageant de l'hybridome).

pour tous les clones issus d'un même hybridome, le nom de l'hybridome, seul, est mentionné dans le texte.

2. SPÉCIFICITÉ ANTINUCLÉOCAPSIDE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les anticorps monoclonaux spécifiques de la souche PV ont été testés pour leur aptitude à reconnaître en immunofluorescence les cellules infectées et fixées à l'acétone. Six d'entre eux reconnaissent des inclusions cytoplasmiques à l'intérieur des cellules infectées par le virus homologue PV. Ils sont donc dirigés contre la nucléocapside. Les surnageants de ces hybridomes ont également été testés en IFI sur des cellules infectées par deux souches fixes de virus rabique (CVS et ERA), et une souche de virus apparentée à la rage (Mokola/RCA). Les résultats du tableau II montrent que les hybridomes PVA, PVB, PVG sécrètent des anticorps qui ne reconnaissent que les souches rabiques PV, CVS et ERA. Ces anticorps sont donc spécifiques d'épitopes présents seulement sur la nucléocapside des virus de la rage.

TABLEAU II—Spécificité antinucléocapside des hybridomes vis-à-vis des souches de virus fixes de la rage et de la souche mokola en immunofluorescence indirecte

Anticorps	Virus			
	PV	ERA	CVS	MOK
PVA1	FNC	FNC	FNC	O
PVB1	FNC	FNC	FNC	O
PVC3	O	O	FNC	FNC
PVD3	FNC	FNC	FNC	FNC
PVG4	FNC	FNC	FNC	O

(FNC=Fluorescence nucléocapside. O=Absence de fluorescence).

TABLEAU III—Spécificité antiglycoprotéine des hybridomes vis-à-vis des souches de virus de rage fixes et de la souche mokola en immunofluorescence indirecte (F) et en test de neutralisation (N)

Anticorps	Souches virales							
	PV		ERA		CVS		MOK	
	F	N	F	N	F	N	F	N
PVE11	Mb	+	Mb	+	Mb	+	O	+
PVF5	Mb	-	NT	NT	NT	NT	O	+
PVI 9	Mb	+	Mb	+	O	+	O	+
PVK11	Mb	+	Mb	+	Mb	+	O	-
PVO12	O	+	O	+	O	+	NT	+
PVP21	O	+	O	-	O	+	NT	-
PVQ16	Mb	+	Mb	+	Mb	+	O	+

(+=neutralisation ; - = pas de neutralisation ; NT=non testé ; Mb=fluorescence de membrane ; O=pas de fluorescence).

L'hybridome PVD sécrète un anticorps qui reconnaît non seulement les souches de rage mais aussi le virus apparenté Mokola. L'épitope décrit par l'anticorps PVD est donc commun aux souches de rage et à la souche apparentée Mokola.

Certains clones de l'hybridome PVG sécrètent des anticorps qui reconnaissent la souche CVS et (ou) la souche Mokola. Cette observation prouve l'existence de colonies-mères hétérogènes et souligne l'importance du clonage pour l'obtention d'anticorps réellement monoclonaux.

Une discordance est apparue, en ce qui concerne l'anticorps PVC, entre les résultats obtenus au test d'immunofluorescence et les résultats obtenus au test immunoenzymatique. En effet, cet anticorps se lie à l'antigène en TIE mais ne reconnaît pas les cellules infectées. Ce point sera discuté ultérieurement.

3. SPÉCIFICITÉ ANTIGLYCOPROTÉINE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Parmi les sept anticorps qui, sur des cellules infectées, ne reconnaissent pas les inclusions cytoplasmiques, cinq reconnaissent les membranes. Ils sont donc spécifiques des antigènes de membranes de cellules infectées.

Deux anticorps — PVO et PVP — ne se fixent pas aux membranes des cellules infectées. Ces deux anticorps appartiennent à la classe M des immunoglobulines. L'utilisation d'un sérum spécifique des immunoglobulines murines de classe G peut expliquer ce résultat. L'anticorps sécrété par l'hybridome PVF, malgré sa positivité en TIE avec la souche homologue, donne avec celle-ci une très faible fluorescence de membrane (Tabl. III).

Les quatre anticorps PVE, PVI, PVK et PVQ, dirigés contre la membrane des cellules infectées par le virus homologue, ont été testés sur des cellules infectées par les souches virales CVS, ERA et Mokola. Ces anticorps reconnaissent les trois souches rabiques, mais ne reconnaissent pas la souche Mokola. Les épitopes reconnus par ces anticorps sur la glycoprotéine rabique n'existent donc pas sur la glycoprotéine du virus apparenté Mokola.

4. ACTIVITÉ NEUTRALISANTE DES ANTICORPS ANTIGLYCOPROTÉINE

Les anticorps dont la spécificité pour les antigènes de membrane de cellules infectées a été déterminée ci-dessus ou dont la spécificité n'a pu être déterminée (PVO et PVP) ont été testés pour leur aptitude à neutraliser *in vitro* l'infectivité des souches de rage PV, ERA, CVS et à neutraliser l'infectivité du virus apparenté Mokola.

Les anticorps sécrétés par les hybridomes PVO et PVP neutralisent le virus homologue PV. Ils sont donc spécifiques de la glycoprotéine. Les anticorps sécrétés par les hybridomes PVE, PVI, PVK et PVQ neutralisent l'infectivité des souches PV, CVS et ERA, ils sont donc eux aussi spécifiques de la glycoprotéine.

Par contre, l'ambiguïté quant à la spécificité anti-glycoprotéine de l'anticorps PVF demeure. Cet anticorps, en effet, reconnaît les cellules infectées par le virus homologue mais est incapable de neutraliser ce virus. Ce résultat ne permet donc pas d'écarter, pour cet anticorps, une spécificité pour la protéine M qui est la deuxième protéine virale de membrane. Il n'en est pas de même pour les anticorps sécrétés par certains clones des hybridomes PVI et PVQ bien que ceux-ci présentent un comportement similaire avec la souche rabique CVS. Leur spécificité pour la glycoprotéine est en effet établie avec la souche homologue qu'ils neutralisent.

Un résultat surprenant est obtenu avec les anticorps sécrétés par les hybridomes PVE (tous les clones testés), PVI, PVQ, PVO et PVF (certains clones). Ces anticorps neutralisent Mokola bien qu'ils ne reconnaissent pas les membranes des cellules infectées par cette souche.

5. UTILISATION DES ANTICORPS ANTI-NUCLÉOCAPSIDE POUR LE TYPAGE ANTIGÉNIQUE DE VIRUS DE RAGE DES RUES ET DE VIRUS APPARENTÉS

Les quatre anticorps monoclonaux antinucléocapside, PVA3, PVBI, PVD3 et PVG4, ont été utilisés pour définir le profil antigénique de 31 souches de virus rabique ou de virus apparentés à la rage (Tabl. IV). Le test a été réalisé par immunofluorescence indirecte sur calques de cerveaux. Les anticorps 502-2 et 422-2 sont des anticorps de référence anti-NC (don du Dr T. J. WIKTOR, Institut Wistar, Philadelphie, USA). L'anticorps 502-2 reconnaît à la fois les souches rabiques et apparentées quelle que soit leur origine géographique. L'anticorps 422-2 ne reconnaît que les souches apparentées : Mokola, Lagos-bat et Duvenhage (8).

Les quatre anticorps reconnaissent toutes les souches rabiques. Deux d'entre eux, PVA3 et PVG4, sont négatifs avec les souches apparentées. Ils permettent donc de faire une distinction entre les virus de la rage et les virus apparentés. A l'inverse, l'anticorps PVBI ne fait pas de distinction entre les souches rabiques et les souches apparentées suivantes : Mokola (Cameroun), Lagos-bat (RCA) et Duvenhage. L'anticorps PVD3 reconnaît les souches rabiques et Mokola, les distinguant des virus Lagos-bat et Duvenhage qu'il ne reconnaît pas.

6. TITRE DES ANTICORPS

Les titres des anticorps ont été calculés pour connaître leur avidité et pour choisir une dilution de travail qui élimine les réactions peu spécifiques. Les titres sont déduits de l'intensité de la réaction antigène-anticorps en TIE contre le virus homologue et en IFI contre plusieurs souches virales dont l'homologue.

6.1. Calcul du titre des anticorps par TIE

Les courbes obtenues avec l'hybridome PVA sont présentées sur les figures 1 et 2. La DO se maintient en plateau tant que l'anticorps est en excès par rapport à l'antigène, puis elle diminue exponentiellement en fonction de la dilution. Le point d'intersection entre la courbe et l'abscisse représente la dilution dont l'inverse

TABL N°IV-Profil antigénique, obtenu par immunofluorescence à l'aide d'anticorps monoclonaux, des virus de rage des rues et des virus apparentés à la rage

Souches	Anticorps monoclonaux					
	502-2	422-2	PVA3	PVG4	PVB1	PVD3
Tunisie (6)	+	0	+	+	+	+
Madagascar (3)	+	0	+	+	+	+
Namibie (2)	+	0	+	+	+	+
France (2)	+	0	+	+	+	+
Thaïlande (1)	+	0	+	+	+	+
Zambie (1)	+	0	+	+	+	+
Ruanda (1)	+	0	+	+	+	+
Maroc (1)	+	0	+	+	+	+
Haute-Volta (1)	+	0	+	+	+	+
Sénégal (2)	+	0	+	+	+	+
Malaisie (2)	+	0	+	+	+	+
Mokola (1) Cameroun	+	+	0	0	+	+
Mokola (1) RCA	+	+	0	0	0	+
Lagos-BAT (1) Nigeria	+	+	0	0	0	0
Lagos-BAT (1) RCA	+	+	0	0	+	0
Duvenhage (1)	+	+	0	0	+	0

(+ = Fluorescence ; 0 = Absence de fluorescence ; () = nombre de souches testées).

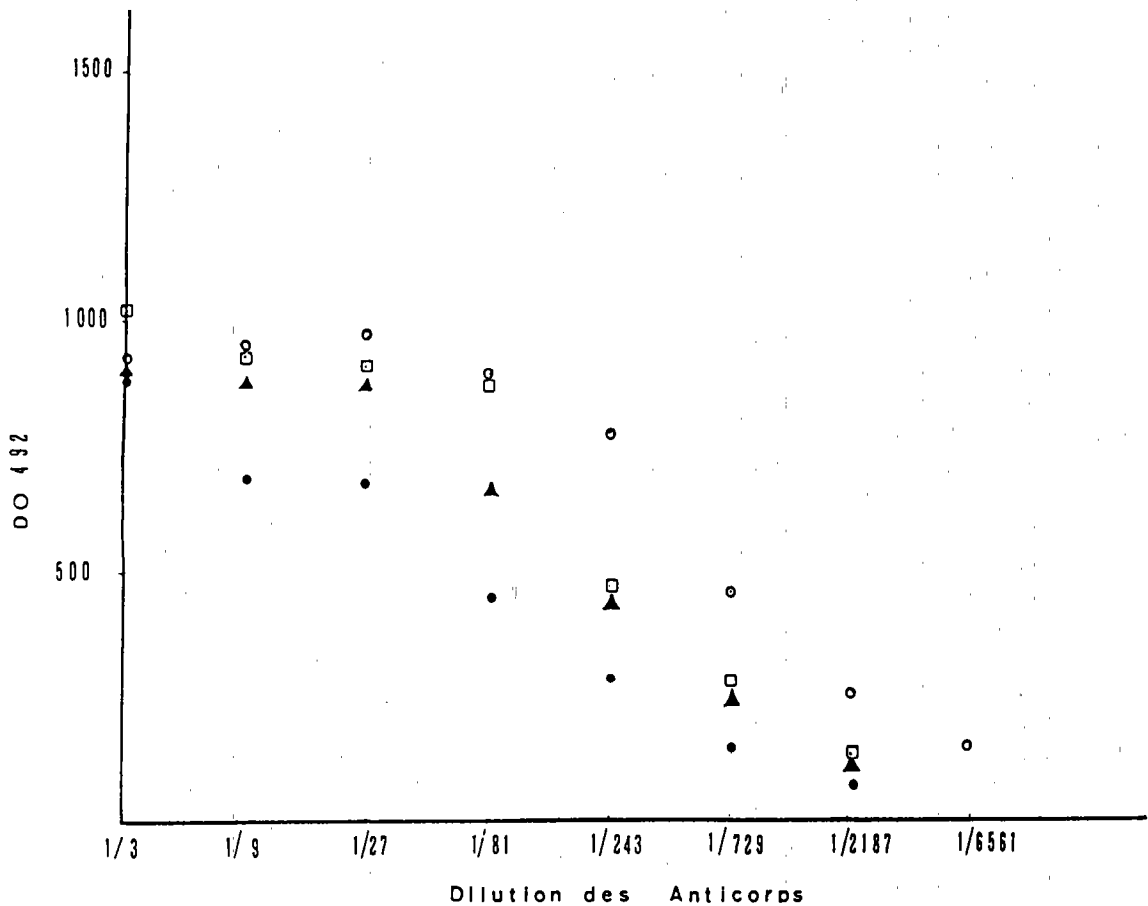


FIG. 4 Courbes de titrage en TIE du surnageant des clones ○---○ PVA3, □---□ PVA2, ▲---▲ PVA1, et ●---● PVA5 vis à vis de la souche PV.

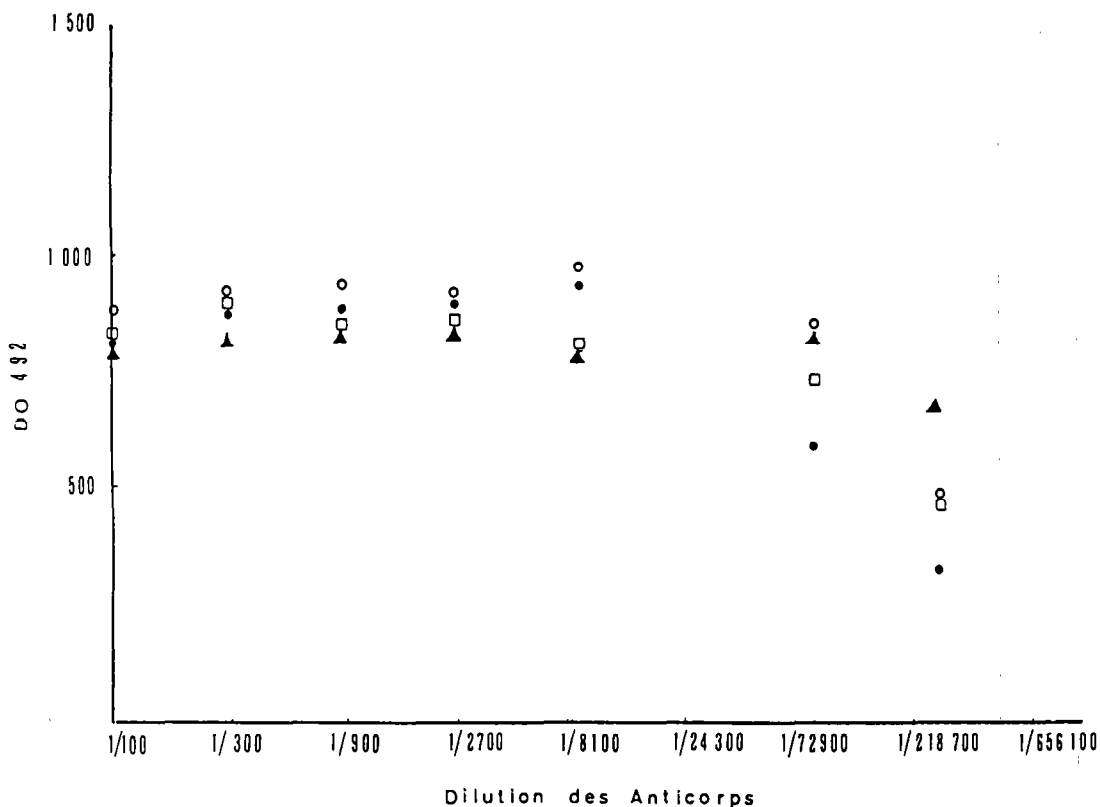


FIG. 2. Courbes de titrage en TIE de l'ascite des clones o---o PVA3, □--□ PVA2, ▲--▲ PVA1, et ●--● PVA5 vis à vis de la souche PV.

est considéré, arbitrairement, comme étant le titre de l'anticorps. On remarque que les clones ont un comportement identique (tracé de la courbe, titre), ce qui est en faveur de la « monoclonalité » de l'hybridome PVA.

Le titre du liquide d'ascite obtenu après injection intra-péritonéale du clone à une souris est en général 100 fois supérieur à celui obtenu avec les surnageants de culture (PVA3 : titre du surnageant 1/2187, titre du liquide d'ascite 1/218700, Tabl. I).

6.2. Calcul du titre des anticorps par IFI

Parmi les anticorps anti-NC, les anticorps sécrétés par 2 clones : PVA3 et PVB1 ont été titrés en IFI contre une série de souches de laboratoire et de souches des rues.

Les clones PVA3 et PVB1 sécrètent des anticorps qui réagissent de manière forte (Tabl. V et VI) aussi bien avec les deux souches de laboratoire (PV et ERA) qu'avec deux souches de rage des rues isolées en France. L'anticorps PVB1 réagit également bien avec les souches

de virus apparentées Lagos-bat (R.C.A.) et Duvenhage. Il montre une faible réaction avec la souche Mokola (Cameroun), puisque l'on n'observe pas de fluorescence si la dilution est supérieure à 1/300. Quelle que soit la dilution, l'anticorps PVA3 est par contre négatif sur les souches apparentées à la rage.

DISCUSSION

Treize hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux spécifiques de la souche de virus de rage Pasteur (PV) ont été sélectionnés et caractérisés. Parmi eux, six sécrètent des anticorps dirigés contre la nucléocapside du virus et sept sécrètent des anticorps dirigés contre les antigènes viraux situés dans la membrane des cellules infectées. Six d'entre eux sont sans ambiguïté spécifiques de la glycoprotéine.

Les anticorps antinucléocapside ont pu être classés dans trois catégories en fonction de leur réactivité avec des souches de rage fixe, des

TABL. N°V-Anticorps monoclonal antinucléocapside PVA3 : Résultat du titrage en immunofluorescence indirecte sur des impressions de cerveaux de souris infectées avec des souches de virus fixes, de virus des rues et de virus apparentés à la rage

Souches virales	Dilution de l'anticorps					
	pur	1/3	1/9	1/27	1/81	1/243
PV	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ERA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Renard (France)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Chien (France)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Mokola (Cameroun)	0	0	0	0	0	0
Mokola (RCA)	0	0	0	0	0	0
Lagos-BAT (Nigéria)	0	0	0	0	0	0
Lagos-BAT (RCA)	0	0	0	0	0	0
Duvenhage	0	0	0	0	0	0

(Pur = ascite diluée au 1/100, 0 = absence de fluorescence, l'intensité de la fluorescence est marquée en +).

TABL. N°VI-Anticorps monoclonal antinucléocapside PVB1 : Résultat du titrage en test d'immunofluorescence indirecte sur des impressions de cerveaux de souris infectées par des souches de virus fixes, de rage des rues et de virus apparentés à la rage

Souches virales	Dilution de l'anticorps					
	pur	1/3	1/9	1/27	1/81	1/243
PV	+++	+++	+++	+++	+++	++
ERA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Renard (France)	+++	+++	++	++	++	++
Chien (France)	+++	+++	+++	+++	++	++
Mokola (Cameroun)	++	+	0	0	0	0
Mokola (RCA)	0	0	0	0	0	0
Lagos-BAT (Nigéria)	0	0	0	0	0	0
Lagos-BAT (RCA)	+++	+++	+++	+++	++	++
Duvenhage	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(Pur = Ascite diluée au 1/100, 0 = Absence de fluorescence ; l'intensité de la fluorescence est indiquée en +)

souches de rage des rues et des souches de virus apparentés :

— une première catégorie comprend les anticorps PVA3 et PVG4. Ils reconnaissent les cellules infectées par toutes les souches de rage testées mais pas les cellules infectées par les virus apparentés à la rage ;

— une deuxième catégorie est réduite à l'anticorps PVB1. Cet anticorps reconnaît toutes les souches de rage testées et réagit aussi avec certains virus apparentés : Lagos-bat (RCA), Duvenhage et Mokola (Cameroun). L'utilisation d'un liquide d'ascite dilué au 1/900 permet toutefois d'éliminer sa réactivité avec la souche Mokola du Cameroun ;

— une troisième catégorie représentée par

l'anticorps PVD3 reconnaît toutes les souches rabiques testées, mais ne reconnaît, parmi les souches apparentées, que les souches Mokola.

La sélection d'une quatrième catégorie d'anticorps spécifiques aux seuls virus apparentés est en cours à partir de souris immunisées avec la souche Mokola (RCA). L'obtention de cette quatrième catégorie d'anticorps permettra de constituer un kit de diagnostic comprenant un anticorps représentatif de chacun des quatre groupes.

Parmi les anticorps spécifiques de la membrane des cellules infectées, six d'entre eux neutralisent l'infectivité du virus utilisé pour l'immunisation des souris. Ils ont donc été

classés dans la catégorie des anticorps dirigés contre la glycoprotéine.

La spécificité du septième anticorps reste ambiguë. En effet, cet anticorps reconnaît faiblement la membrane des cellules infectées et ne neutralise pas le virus. En test d'immunofluorescence des images de membrane peu lumineuses sont obtenues avec des anticorps dirigés contre la protéine M (résultats non publiés). Cette protéine, située à la face interne de la membrane plasmique de la cellule infectée et à l'intérieur de la particule virale (6), ne jouerait pas de rôle dans la neutralisation, ce qui expliquerait le caractère non neutralisant d'un anticorps qui lui serait spécifique.

L'anticorps PVF pourrait aussi être dirigé contre l'actine présente sur le virion et à la surface des cellules infectées (18). Cette hypothèse a pu être écartée car l'absorption de l'anticorps sur des cellules BHK-21 non infectées a été sans effet (résultats non présentés ici).

L'anticorps PVF pourrait également être un anticorps dirigé contre la glycoprotéine mais dénué d'effet neutralisant. De tels anticorps ont déjà été décrits pour la rage (9), (13). L'absence d'effet neutralisant d'un anticorps anti-glycoprotéine peut être expliqué par deux mécanismes hypothétiques. Le premier mécanisme postule l'existence, sur la glycoprotéine rabique, de deux zones biologiquement différentes : une zone biologiquement active sur laquelle la fixation d'un anticorps a pour effet de neutraliser le virus et une zone biologiquement inactive sur laquelle la fixation d'un anticorps n'a aucun effet sur l'infectivité du virus. Le deuxième mécanisme postule l'existence de deux sortes d'anticorps : des anticorps de forte affinité pour les épitopes de la glycoprotéine et des anticorps de faible affinité. La différence d'affinité dépendrait de l'adéquation de l'anticorps pour l'antigène. Une mauvaise adéquation serait due à une différence de conformation entre l'épitope « vu » par le système immunitaire de la souris et l'épitope présent à la surface du virion. Elle proviendrait de la présence de glycoprotéines dénaturées dans l'échantillon de virus utilisé pour l'immunisation des souris. L'anticorps PVF serait ainsi, dans l'hypothèse du premier mécanisme, un anticorps spécifique de la partie de la glycoprotéine intrinsèquement inactive. Dans l'hypothèse du second mécanisme, il serait spécifique d'un épitope de la glycoprotéine dénaturée, peu accessible sur la glycoprotéine native.

Une modification de la conformation des épitopes présents sur le virus et sur les cellules infectées pourrait aussi expliquer les résultats observés avec la souche Mokola. Certains anticorps anti-glycoprotéine neutralisent l'infectivité du virus Mokola mais ne reconnaissent pas les cellules infectées par cette souche. Les épitopes seraient, dans ce cas, accessibles aux anticorps quand ils seraient situés à la surface des particules virales. Les épitopes seraient, au contraire, inaccessibles aux anticorps quand ils seraient situés sur la glycoprotéine insérée dans les membranes de cellules infectées. Il pourrait en être de même avec la nucléocapside et l'anticorps PVC qui reconnaît en TIE la souche homologue PV mais ne reconnaît pas les cellules infectées par cette même souche. L'anticorps PVC reconnaît sur le virus un épitope de nucléocapside inaccessible dans les inclusions cytoplasmiques des cellules infectées. Ces deux exemples soulignent l'importance de la conformation de l'épitope pour une bonne reconnaissance de l'antigène par un anticorps monoclonal. Ils illustrent l'intérêt que présente, pour la caractérisation des anticorps monoclonaux, l'utilisation non pas d'un test mais de plusieurs lorsque ceux-ci sont disponibles.

En conclusion, il faut insister sur l'importance grandissante des anticorps monoclonaux dans le diagnostic. Ces réactifs apportent une stabilité et une sensibilité très appréciées dans des tests standardisés. Pour la rage et les virus qui lui sont apparentés, la sélection et la caractérisation des anticorps monoclonaux anti-nucléocapsides présentés dans cette étude rendent possible l'élaboration d'un kit de diagnostic qui permettra d'identifier sur calques dé cerveau ou sur cellules infectées, rapidement et sans ambiguïté, la nature de l'agent infectieux.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient M. D. COUDRIER pour son excellente assistance technique. Geneviève LIBEAU tient à remercier le Dr. SUREAU qui a bien voulu l'accueillir dans son laboratoire. Ce travail a été effectué à l'Institut Pasteur avec la subvention de recherche INSERM n° 432.

RESUMEN

LIBEAU (G.), LAFON (M.), ROLLIN (P. E.). — Estudio de la especificidad de anticuerpos monoclonales obtenidos con la cepa de virus de rabia Pasteur PV. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1984, **37**, (4) : 383-394.

Se caracterizaron anticuerpos monoclonales obtenidos con la cepa de virus fijo PV de rabia respecto a su reactivi-

dad con las estructuras del nucleocapsido o de la glicoproteína de la membrana de diferentes cepas rábicas o de cepas emparentadas con la rabia. Los autores insisten en la importancia práctica de tales anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de rutina.

Palabras claves : Rabia - Anticuerpos monoclonales.

BIBLIOGRAPHIE

- ABELSETH (M. K.). An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. *Canad. vet. J.*, 1964, **5** : 279-286.
- ATANASIU (P.), SAVY (V.) et PERRIN (P.). Epreuve immunoenzymatique pour la détection rapide des anticorps antirabiques. *Annls Microbiol. Inst. Pasteur*, 1977, **128 A** : 489-498.
- ATANASIU (P.), TSIANG (H.), REULARD (P.), AIGUILLON (F.), LAVERGNE (M.) and ADAMOWITCZ (Ph.). Zonal centrifuge purification of human rabies obtained on bovine fetal kidney cells. Biological results. In : Joint WHO/IABS Symposium (Rabies III), Marburg/Lahn 1977. Basel, S. Karger, 1977, pp. 35-44 (Development in Biological Standardization 40).
- BOULGER (L. R.), PORTEFIELD (J. S.). Isolation of a virus from Nigerian fruits bats. *Trans. r. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1958, **62** : 421-424.
- COONS (A. H.), KAPLAN (M. H.). Localization of antigen in tissue cell II : Improvement in method for detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. exp. Med.*, 1950, **91** : 1-13.
- COX (J. H.), WEILAND (F.), DIETZSCHOLD (B.), SCHNEIDER (L. G.). Reevaluation of the structural proteins M1 and M2 of rabies virus. In : BISHOP (D. H. L.), COMPANS (R. W.), ed. The replication of negative strand viruses. North Holland, Elsevier, 1981, pp. 639-645.
- EY (P. L.), PROWSE (S. J.), JENKIN (C. R.). Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry*, 1978, **15** : 429-436.
- FLAMAND (A.), WIKTOR (T. J.) and KOPROWSKI (H.). Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus protein. I. The nucleocapsid protein. *J. gen. Virol.*, 1980, **48** : 97-104.
- FLAMAND (A.), WIKTOR (T. J.), KOPROWSKI (H.). Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus protein. II. The glycoprotein. *J. gen. Virol.*, 1980, **48** : 105-109.
- GOLDWASSER (R. A.), KISSLING (R. E.). Fluorescent antibody staining of street and fixed virus antigen. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1958, **98** : 219-223.
- KISSLING (R. E.). Growth of rabies virus in non nervous tissue culture. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1958, **98** : 223-225.
- KOPROWSKI (H.), WIKTOR (T. J.). Monoclonal antibodies against rabies virus. In : KENNETH (R. H.), Mc KEAN (T. J.), ed. Monoclonal antibodies hybridomas : a new dimension in biological analysis. New York, Plenum Publishing Corp., 1980. pp. 335-351.
- LAFON (M.), WIKTOR (T. J.), MACFARLAN (R. I.). Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein : analysis with monoclonal antibodies. *J. gen. Virol.*, 1983, **64** : 843-851.
- LE GONIDEC (G.), RICKENBACH (A.), ROBIN (Y.) et HEME (G.). Isolement d'une souche Mokola au Cameroun. *Annls Microbiol. Inst. Pasteur*, 1978, **129 A** : 215-219.
- LÉPINE (P.) et GAMET (A.). Sur l'évolution des virus fixes et la souche Pasteur en particulier. In : International symposium on rabies (II), Lyon 1972. Basel, S. Karger, 1974, pp. 60-66 (Symposia Series in Immunological Standardization, 21).
- LIBEAU (G.) and LAFON (M.). Production of monoclonal antibodies against Pasteur virus (P. V. strain) : problems and results. In : Monoclonal antibodies Symposium, Paris, juillet 1983. Basel, S. Karger 1984. pp. 213-218 (Development in Biological Standardization, vol. 57).
- LOWRY (O. H.), ROSENBOUGH (N. J.), FARR (A. L.), RANDALL (R. T.). Protein measurement with the FOLIN phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193** : 265-275.
- NAITO (S.), MATSUMOTO (S.). Identification of cellular actin with the rabies virus. *Virology*, 1978, **91** : 151-163.
- SALUZZO (J. F.), ROLLIN (P. E.), DAUGUET (C.), DIGOUTTE (J. P.), GEORGES (A. J.) et SUREAU (P.). Premier isolement du virus Mokola à partir d'un rongeur (*Lophuromys sikapusi*). *Annls Virol. Inst. Pasteur*, 1984, **135 E** : 57-66.
- SOKOL (F.), KUWERT (E.), WIKTOR (T. J.), HUMMELER (K.), KOPROWSKI (H.). Purification of rabies virus grown in tissue culture. *J. Virol.*, 1968, **2** : 836-849.
- SOKOL (F.), STANCEK (D.), KOPROWSKI (H.). Structural proteins of rabies virus. *J. Virol.*, 1971, **7** : 241-249.
- SUREAU (P.), GERMAIN (M.), HERVÉ (J. P.), GEOFFROY (B.), CORNET (J. P.), HEME (G.) et ROBIN (Y.). Isolement du virus Lagos-Bat en empire centrafricain. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1977, **70** : 467-470.
- TIGNOR (G. H.), MURPHY (F. A.), CLARK (H. F.), SHOPE (R. E.), MADORE (P.), BAUER (S. P.), BUCKLEY (S. M.) and MEREDITH (C. D.). Duvenhage virus : morphological, biochemical, histopathological and antigenical relationship to the rabies serogroup. *J. gen. Virol.*, 1977, **37** : 595-611.
- WIKTOR (T. J.), DIETZSCHOLD (B.), LEAMNSON (R. N.) and KOPROWSKI (H.). Induction and biological properties of defective interfering (D. I.) particles of rabies virus. *J. Virol.*, 1977, **21** : 626-634.
- WIKTOR (T. J.), FLAMAND (A.) and KOPROWSKI (H.). Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies related virus. *J. virol. Methods*, 1980, **1** : 33-44.
- WIKTOR (T. J.), GYORGY (E.), SCHLUMBERGER (H. D.), SOKOL (F.) and KOPROWSKI (H.). Antigenic properties of rabies virus components. *J. Immun.*, 1973, **110** : 269-276.
- WIKTOR (T. J.) and KOPROWSKI (H.). Antigenic variants of rabies virus. *J. exp. Med.*, 1980, **152** : 99-112.