

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences de la Nature et de la Vie

Filière Sciences Biologique

Option : Génétique et Physiologie

Thème

**La mise en évidence d'agents pathogènes viraux dans
les laits d'élevages, par la détection d'effets
cytopathogène in vitro sur la lignée cellulaire
MDBK (Madin-Darby bovine kidney)**

Présenté par : MAHMOUDI Imene

Devant le jury composé de :

ROUIBI A	MCA	USDB	President
MOHAMED SAID R	MAA	USDB	Examineur
GUETARNI D	Professeur	USDB	Promoteur
BAAZIZE-AMMI D	MAA	USDB	Co-Promotrice

REMERCIEMENTS

Initialement ce mémoire n'aurait pas été réalisé sans le courage, la santé et la patience que dieu le tout puissant ma donné.

*Je tiens à remercier en premier lieu mon promoteur **le professeur GUITARNI Djamel** pour son accueil bénéfique au sein de son laboratoire « **ECOQUAPA** » de l'Université SAAD Dahlab-Blida 1, ainsi que pour ces conseils précieux tout au long de mon travail et sa patience à mon égard, « merci monsieur ».*

*Mes vifs remerciements s'adressent à ma Co-promotrice **madame BAAZIZE AMMI Djamila** pour avoir accepté d'encadrer ma thèse, sa disponibilité, ses conseils techniques et scientifiques ainsi que sa gentillesse envers moi et son encouragement tout au long de mon travail avec elle.*

J'adresse particulièrement mes remerciements aux membres du Jury qui ont accepté d'évaluer mon travail.

*Je remercie **Mr MOHHAMED SAID Ramdan** notre responsable d'option qui nous a orientés et pris en charge tout au long de notre cursus universitaire de la 3eme année jusqu'à la 5eme année.*

*Un remerciement particulier pour Dr DERRAR et tout le personnel du laboratoire « **Grippe et Virus respiratoire** » de l'institut pasteur d'Algérie (IPA), Annexe Sidi Fredj (Alger).pour leur chaleureux accueil au sein de ce laboratoire où j'ai passé de très bons moments et j'ai appris beaucoup de choses. J'ai eu vraiment la chance de réaliser mon travail dans ce laboratoire et d'avoir vécu cette expérience inoubliable.*

*Un immense merci pour mes très chers **parents SAID et FATIHA, et mon mari FOUAD** sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, merci pour votre amour, votre soutien, votre présence, votre encouragement et surtout pour votre patience. Vous avez toujours cru en moi et je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté. Merci encore à vous*

Je dédie ce mémoire

A mes très chers parents, mes sœurs HANENE, RACHA et mon frère
FAOUZI

A mon mari

A ma grand-mère, mes tantes, oncles et cousins, a NAIMA, LOUCIF et
ZIZI MOUSSA

A mes amis du parcours universitaire : les généticiens de la promo 2012, a
YASMIN, HANENE, MALIK, MEHDI, SID ALI, CHAWKI, IKRAM,
RABEA, MERIEM, KARIMA, RYAD

A mes amies d'enfance, HAYET ET IBTISSEM

A toutes les personnes qui m'ont aidé à l'IPA, ZAHIDA, BAYA, AKILA

A mes collègues, LAMIA, KENZA, SOUMIA, les 2 AMINA et SAMIRA

RESUME

La mammite est définie comme une réaction inflammatoire du parenchyme de la glande mammaire. Elle est caractérisée par des changements physiques, chimiques et généralement bactériologiques du lait, et par des changements pathologiques du tissu glandulaire du pis.

La mammite est associée à la présence de bactéries. Des causes fongiques, virales, traumatiques et toxiques peuvent être enregistrées

En raison du nombre élevé de causes inconnues de mammite, il est important d'étudier le rôle des virus dans l'étiologie de la mammite bovine.

La présence des virus dans le lait a été mise en évidence dans la présente étude, par la technique de référence en virologie ; le diagnostic direct sur culture cellulaire, en observant l'apparition d'effet cytopathogène (ECP) sur la lignée cellulaire Madin-Darby bovine kidney (MDBK) inoculé par nos échantillons de lait.

Les résultats ont permis de mettre en évidence la présence d'au moins deux pathogènes viraux différents dans un seul échantillon de lait (soit un taux de 14,28%) sur le total des sept échantillons analysés.

Il est à noter que les ECP positifs observés sont survenus sur les nappes cellulaires inoculées avec le culot et le surnageant du même échantillon de lait.

Sur la base des résultats obtenus, nous pouvons dire que les infections virales peuvent jouer un rôle direct ou indirect dans l'étiologie de la mammite bovine; pour cela il faut porter davantage d'attention afin de déterminer les agents pathogènes viraux qui peuvent intervenir dans l'apparition de ces mammites bovines.

Mots -clés: Mammite. Virus. Culture cellulaire. Effet cytopathogène (ECP). Diagnostic viral

ABSTRACT

Mastitis is defined as inflammation of the mammary parenchyma. It is characterized by physical, chemical and usually bacteriological changes in the milk and pathological changes in the glandular udder tissue. Mastitis is associated with the presence of bacteria. Fungal, viral, toxic and traumatic causes can be noted

Due to the high percentages of unknown causes of mastitis, it is obvious to study the role of viruses in the etiology of bovine mastitis.

In this study, we contribute to the detection of viral pathogens in milk from healthy cows or suffering from clinical or subclinical mastitis.

The presence of virus in the milk was demonstrated by the virology reference technique; the direct diagnosis on cell culture by observing the appearance of cytopathogene effect (CPE) on MDBK cell line inoculated with our milk samples.

The results were used to identify the presence of at least two different viral pathogens in a single sample of milk (or a rate of 14.28%) on the total of seven samples analyzed.

It should be noted that the observed positive ECP are occurring on the cell culture layers inoculated with the pellet and supernatant of the same milk sample.

Based on the results obtained, we can say that viral infections can play a direct or indirect role in the etiology of bovine mastitis; therefore their importance in the etiology of bovine mastitis and their economical impact needs further attention.

Key –word: Mastitis. Virus. Cell culture. cytopathogene effect (CPE). Viral diagnosis

المخلص

يعرف التهاب الضرع برد فعل للالتهابات الغدة الثديية التي يمكن أن تكون لأسباب معدية أو السامة. يتميز التهاب الضرع بالتغيرات الفيزيائية والكيميائية وعادة البكتريولوجية في الحليب والتغيرات المرضية في الأنسجة الغددية لضرع. ويرتبط التهاب الضرع مع وجود البكتيريا. ويمكن ملاحظة الأسباب الفطرية الفيروسية، الأسباب السامة والفيزيائية نظرا للنسب العالية لأسباب غير معروفة من التهاب الضرع، فمن الضروري دراسة دور الفيروسات في مسببات التهاب الضرع في الأبقار.

في هذه الدراسة، نساهم في الكشف عن المسببات الفيروسية في حليب الأبقار الغير مصابة و المصابة بالتهاب الضرع الإكلينيكي أو تحت الإكلينيكي.

وقد تجلى وجود الفيروس في الحليب بواسطة التقنية الرائدة في الفيروسولوجيا. التشخيص المباشر على مزرعة خلايا من خلال مراقبة ظهور تأثير الاعتلال الخلوي (CPE) على طبقة الخلايا MDBK الملقحة بعينات الحليب استخدمت النتائج لتحديد وجود اثنين على الأقل من الفيروسية مسببات الأمراض المختلفة في عينة واحدة من الحليب (أو ما نسبته 14.28%) من إجمالي 7 عينات التي تم تحليلها.

تجدر الإشارة إلى أن ECP الايجابي الملحوظ في طبقات الخلايا الملقحة بالطافي والراسب من عينة الحليب نفسها. واستنادا إلى النتائج التي حصل عليها، يمكننا القول إن الالتهابات الفيروسية يمكن أن تلعب دورا مباشرا أو غير مباشر في مسببات التهاب الضرع الأبقار؛ ولأهميتها في مسببات التهاب الضرع الأبقار وتأثيرها الاقتصادي تحتاج إلى مزيد من الاهتمام.

الكلمات المفتاحية: التهاب الضرع. الفيروس. الزراعة الخلوية. الاعتلال الخلوي (CPE). التشخيص الفيروسي

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** différentes structures des génomes viraux
- Figure 2 :** Schéma d'une particule virale dans le cas d'un virus nu (A) et d'un virus enveloppé(B)
- Figure 3 :** présentation des quatre groupes de technique de diagnostic en virologie
- Figure 4 :** Nappe cellulaire de la lignée MDBK sous microscope inversé au GRX 40
- Figure 5. :** Effets des vitesses de congélation sur les cellules. (John, 2004)
- Figure 6 :** Virage de l'indicateur de pH suivant l'acidification ou l'alcalinisation du milieu de culture
- Figure 7 :** Effets cytopathogène, observés à l'état frais, des virus herpès simplex sur les
- Figure 8 :** Effets cytopathogène, observés à l'état frais, du virus para-influenza sur Hep2
- Figure 9 :** Effets cytopathogène, observés à l'état frais, produits par un adénovirus de type 5 sur cellules HEp2.
- Figure 10 :** Une nappe cellulaire (MDBK) au GRX40
- Figure 11 :** Microscope inversé
- Figure 12 :** Cellule de Malassez
- Figure 13 :** Cellule de NEUBAUER
- Figure 14 :** Remplissage et comptage cellulaire avec une cellule Malassez sous microscope optique
- Figure 15 :** la cellule NEUBAUER et comptage cellulaire sous un microscope inversé
- Figure16 :** Observation avec le microscope inverse
- Figure 17 :** Ajouter d'EMEM
- Figure 18 :** les différents degrés de confluence d'une nappe cellulaire MDBK
- Figure 19 :** La contamination par des levures observée sur MDBK sous microscope inverse au GX40
- Figure 20 :** La contamination bactérienne observée sur MDBK sous microscope inverse au GX40
- Figure 21 :** la nappe cellulaire du Témoin a T0
- Figure 22 :** la nappe cellulaire du Témoin a T= 72h
- Figure 23 :** la nappe cellulaire du Témoin a T= 5jours
- Figure 24 :** La nappe cellulaire inoculée avec le surnageant frais du prélèvement 2 après 72h
- Figure 25 :** La nappe cellulaire inoculé avec le surnageant frais du prélèvement 2 après 5 jours
- Figure 26 :** La nappe cellulaire inoculée avec le culot du prélèvement 2 après 72h
- Figure 27 :** La nappe cellulaire inoculée avec le culot du prélèvement 2 après 5 jours

LISTE DE TABLEAUX

Tableau I : Des données générales sur la lignée MDBK «Madin-Darby bovine kidney »

Tableau II : Résultats de la numération cellulaire obtenu à partir des 7 vaches analysés et les volumes à centrifuger pour l'obtention du culot

Tableau III : Les résultats de l'optimisation de la densité cellulaire à ensemercer

Tableau IX : les résultats de l'inoculation des cellules MDBK par les prélèvements

Tableau X : L'interprétation en chiffres des résultats de l'isolement viral

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribose Nucléaire

ARN: Acide Ribosomique Nucléaire

BHK-21: Baby Hamster Kidney

BHV1 : Bovin Herpès Virus type 1 (L'herpès virus bovin de type 1)

BHV2 : Bovin Herpès Virus type 2 (L'herpès virus bovin de type 2)

BHV4 : Bovin Herpès Virus type 4 (L'herpès virus bovin de type 4)

BLV: Bovine Leukemia Virus (Le virus de la leucémie bovine)

bPIV3: Bovine parainfluenza virus type 3

BSA: Bovin Sérum Albumin

BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus (Le virus de la diarrhée virale bovine)

CCS: Comptage Cellules Somatique

CMT: California Mastitis Test

CMV: CytoMégaloVirus

CP: CytoPathogène

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: DiMéthylSulfOxyde

EBL: Embryonic Bovine Lung (cellules embryonnaires bovines de poumon)

ECP: Effet CytoPathogène

EDTA: EthyleneDinitriloTetraacetic Acid

EGF: Epidermal Growth Factor

EMEM: Eagle's Minimal Essential Medium

FBS: Foetal Bovine Serum (sérum de veau fœtal)

FGF: Fibroblast Growth Factor

Hela: Human epithelial carcinoma (Henrietta Lacks)

Hep-2: Human larynx carcinoma

hPIV3: Human Parainfluenza Virus type 3

IBR: Infectious Bovine Rhinotracheitis

IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1

IGF-2: Insulin-like Growth Factor-2

Kb: Human nasopharyngeal carcinoma

MDBK: Madin-Darby Bovine Kidney

MDCK: Madin-Darby Canine Kidney

NCP: Non-Cytopathogène

NGF: Nerve Growth Factor

PBS: Tampon Phosphate Salin

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PIV3: ParaInfluenza Virus type 3

VIB: Virus de l'Immunodéficience Bovine

VZV: Virus Zona-Varicelle

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

RESUME

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES VIRUS

I. Définition.....03

II. Structure.....03

III. La multiplication virale.....05

IV. Conséquences de l'infection virale.....06

V. Le diagnostic virologique.....07

CHAPITRE II : LE ROLE DES VIRUS DANS LES MAMMITES

I. Introduction.....08

II. Les virus et les mammites.....08

II.1. Les virus intervenant directement dans l'apparition de mammites.....08

II.1.1. Le virus herpétique de type 1 (BHV1).....08

II.1.2. Le virus herpétique de type 4 (BHV4).....09

II.1.3. Le virus de la fièvre aphteuse.....10

II.1.4. Le virus Parainfluenza de type 3 (PI3).....11

II.1.5. Le virus de la leucémie bovine (BLV).....11

II. 2. Les virus intervenant indirectement dans l'apparition de mammites.....12

II. 2.1. Le virus herpétique de type 2 (BHV2).....12

II. 2.2. Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV).....12

II. 2.3. Le virus de l'immunodéficience bovine (VIB).....13

CHAPITRE III : ISOLEMENT VIRAL SUR CULTURE CELLULAIRE

I. Introduction.....14

II. L'isolement en culture cellulaire14

III. La culture cellulaire14

III.1. Les systèmes de culture cellulaire.....	15
III.2. Lignée cellulaire	15
III.3. L'entretien d'une culture de lignée cellulaire.....	17
IV. L'effet cytopathogène (ECP).....	21
ARTIE EXPERIMENTALE	
CHAPITRE IV MATERIEL ET METHODES	
I. CADRE DE L'ETUDE.....	24
II. MATERIEL.....	24
II.1. Matériel biologique.....	24
II.2. Matériel non biologique.....	25
III METHODES.....	27
III.1. Le traitement et conservation des échantillons de lait.....	27
III.2. Le maintien de la lignée cellulaire MDBK.....	28
III.3. L'inoculation.....	31
III.4. Lecture des nappes cellulaire.....	32
CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION	
I. Le traitement des échantillons de lait Pour l'obtention des culots cellulaire	33
II. Le maintien de la lignée cellulaire MDBK.....	34
II. L'inoculation et la lecture des nappes cellulaires.....	38
CONCLUSION.....	49
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

INTRODUCTION

Les mammites sont les affections les plus communes et les plus coûteuses pour les producteurs de lait (Boufaïda et al 2012), ce qui en fait une problématique majeure pour l'industrie laitière, dans la plupart des pays du monde. En effet, sur cent vaches laitières, on compte quatre-vingt à quatre-vingt-dix épisodes de mammites annuellement (Hogan et Smith., 2003). La mammite est une inflammation du parenchyme de la glande mammaire associée dans 90% des cas à la présence de bactéries. Des causes fongiques, virales et traumatiques se partagent le reste des cas (Tadich et al ., 1998).

En Algérie, comme dans la plupart des pays, les mammites bovines constituent une pathologie dominante dans les élevages bovins laitiers. Des études approfondies sont indispensables afin d'établir des systèmes de contrôle des facteurs impliqués dans les cas de mammites diagnostiqués dans les exploitations laitières en Algérie. L'identification de la nature et la prévalence des microorganismes responsables de mammites bovine est essentielle pour la restauration et l'adaptation des systèmes de maîtrise des mammites aux différentes situations épidémiologiques. En fait, il faut mettre en place des études épidémiologique et de contrôle de qualité du lait cru de vaches.

D'après Wellenberg (2002) et Kalman (2004) certaines mammites sont d'origine inconnue ce qui suggère soit la difficulté à mettre en évidence certaines bactéries, soit d'autres causes non recherchées telles que les virus pouvant être à l'origine de ces mammites. En effet de nombreux agents pathogènes viraux ont été détectés dans le lait de vaches atteintes de mammites clinique et subcliniques ou des lésions de la peau et du canal du trayon. Cependant de nombreux travaux ont porté sur l'aspect bactériologique de l'infection mammaire, sans s'intéresser à l'infection viral

Les différentes méthodes de diagnostic viral utilisées à ce jour sont soit directes, avec mise en évidence du virus, soit indirectes avec mise en évidence des anticorps développés lors d'infections.

Le diagnostic virologique direct consiste à mettre en évidence directement le virus ou l'effet pathogène du virus. Trois méthodes sont le plus souvent employées: l'isolement viral sur cultures cellulaires, la mise en évidence directe des antigènes viraux par réaction d'immunofluorescence et la détection directe du génome viral par les techniques d'amplification de gènes comme la PCR (polymerase chain reaction).

Sur culture cellulaire les signes de multiplication virale induisent l'apparition de l'effet cytopathogène (ECP) défini par un changement de l'aspect des cellules, visible en microscopie optique (accumulation des virus produits ou des antigènes dans le noyau, ou dans le cytoplasme des cellules infectées).

Le présent travail consiste à la mise en place d'un protocole, permettant la mise en évidence d'agents pathogène viraux in vitro, dans des prélèvements de lait, par l'apparition d'effet cytopathogène sur une culture cellulaire de la lignée MDBK (Madin-Darby bovine kidney)

partie bibliographique

CHAPITRE I

LES VIRUS

I. Définition

Les virus sont des entités dont le génome est un élément d'acide nucléique, acide désoxyribonucléique (ADN) ou acide ribonucléique (ARN), qui se reproduisent à l'intérieur de cellules vivantes et qui utilisent le mécanisme de synthèse de ces cellules pour la formation des virions qui contiennent le génome viral et le transfèrent à d'autres cellules (Herve ., 2009). Ainsi définis, les virus représentent donc des êtres biologiques qui sont différents des bactéries et des protozoaires. Leur structure et surtout leur mode de reproduction très particulier conditionnent la majeure partie de leurs propriétés biologiques et de leur pathogénicité (Herbein, 2003).

II. Structure

Toute particule virale est constituée d'au moins deux éléments constants et obligatoires :

- le génome
- la capsid
- l'enveloppe est une structure périphérique facultative qui entoure la nucléocapsid.

➤ Le génome viral

Il est de nature nucléotidique et composé d'acide nucléique (ADN ou ARN) bicaténaire ou monocaténaire linéaire ou circulaire, segmenté ou non segmenté (Cf. Figure1) (Mammette, 2002)

La nature de l'acide nucléique viral constitue un premier critère de classification des virus.

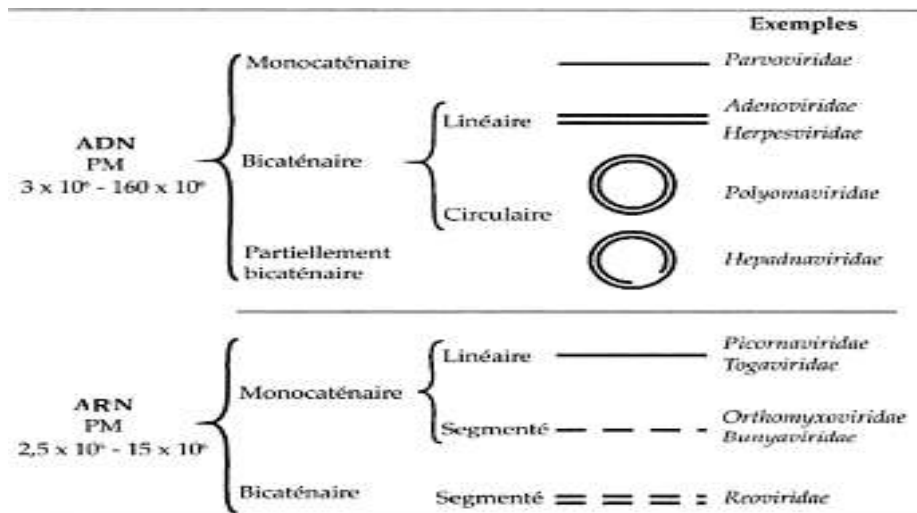


Figure 1: différentes structures des génomes viraux (Mammette, 2002)

➤ Les capsides virales

Le génome, contenant l'information génétique constitue la partie « noble » du virion. La protection de l'acide nucléique viral est assurée dans le milieu extra cellulaire par une structure protéique, la capside, qui possède de plus chez les virus sans enveloppe des signes de reconnaissance de la cellule hôte (Mammette, 2002 ; Cohen, 2002).

➤ Les enveloppes virales

Certaines familles virales possèdent, autour de la nucléocapside, une structure ou un ensemble de structures périphériques facultatives que l'on appelle enveloppe. Les virus qui possèdent une enveloppe sont dits enveloppés, les autres sont dits nus. (Cf. Figure 2) (Herve ,2009).

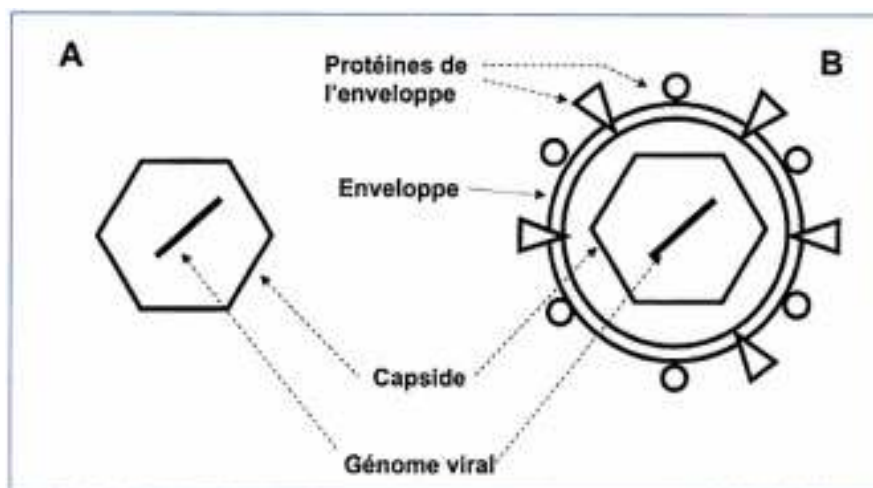


Figure 2 : Schéma d'une particule virale dans le cas d'un virus nu (A) et d'un virus enveloppé (B) (Cohen, 2002)

La plupart des enveloppes virales proviennent des systèmes membranaires de la cellule hôte (elles prennent le nom de peplos). Selon HERBEIN, (2003) Trois origines membranaires sont possibles :

- la membrane nucléaire, au niveau de son feuillet interne (herpès virus)
- les systèmes membranaires intra cytoplasmiques comme le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi
- la membrane plasmique (myxovirus).

III. La multiplication virale

La multiplication virale est un phénomène complexe au cours duquel le virus va détourner la machinerie cellulaire à son profit. (Mammette, 2002). Le cycle de la multiplication virale dépend de deux facteurs en relation avec la cellule infectée :

- La sensibilité d'une cellule pour un virus définit sa capacité à pouvoir être infecté par un virus donné. Elle dépend de la nature de la cellule et de l'espèce animale. L'ensemble des cellules sensibles à un virus définit son spectre d'hôtes (Mammette, 2002)
- La permissivité d'une cellule se définit par le fait qu'elle permet un cycle viral productif. Cependant, même si les cellules sont sensibles, elles peuvent ne pas être permissives (Helak, 2008)

• Les étapes générales du cycle de la multiplication viral

Les différences de structure et de génome des virus ont des implications importantes pour le mécanisme utilisé lors de leur multiplication dans la cellule hôte. En effet, même en ayant des structures et des génomes similaires, les virus peuvent chacun présenter un cycle viral particulier. Néanmoins, malgré ces différences, il est possible de discerner un schéma général de multiplication viral (Lansing et al., 2010).

Le cycle d'infection d'une cellule par un virus peut être décomposé en trois grandes étapes :

- L'attachement, la pénétration, et la décapsidation qui conduisent à l'internalisation du génome viral dans la cellule cible.
- L'expression des gènes et la réplication qui vont, respectivement, assurer la synthèse des protéines codées par le génome viral et permettre la multiplication de ce génome.
- L'assemblage et la sortie qui vont mener à la production et la libération de particules virales infectieuses, capables de propager l'infection à d'autres cellules (Harvey, 2005).

IV. Conséquences de l'infection virale

Les conséquences de l'infection virale sont variables, elle peut être :

- **Une infection productive :** Elle conduit à la production de nouveaux virions. Ce type d'infection peut être :
 - Lytique, c'est-à-dire conduisant à la lyse de la cellule infectée et donc à sa mort. La multiplication des virus capables de provoquer ce type d'infection se traduit en culture cellulaire par l'apparition de lésions morphologiques caractéristiques désignées par effet cytopathogène ou ECP. L'effet cytopathogène est caractéristique d'un virus donné, il est ainsi à la base du diagnostic virologique (Mammette, 2002).
 - Non lytique, c'est le cas de certains virus qui sont libérés de la cellule hôte par bourgeonnement cytoplasmique (Helak, 2008).
- **Une infection abortive :** Même si elles sont sensibles, les cellules infectées peuvent ne pas être permissives, ne permettant qu'une faible production de virions ou la production de virions déficients (Helak, 2008).
- **Une infection persistante :** Elle est due à une persistance du virus à l'intérieur de la cellule qu'il infecte. On en distingue 2 types :
 - Infection latente où le virus est présent à l'intérieur de la cellule mais sans se multiplier. Il y est alors présent à l'état de génome, soit intégré aux chromosomes cellulaires et on parle de provirus (exemple du virus de l'immunodéficience humaine présent à l'état de latence dans le noyau des lymphocytes CD4+) soit libre extra-chromosomique ou épisode (exemple du virus herpes simplex virus capable de persister sous forme latente dans les ganglions sensitifs). Au cours de ce type d'infection, le virus peut se réactiver et reprendre un cycle viral complet (Tardif, 2005).
 - Infection chronique productive où le virus s'exprime avec production virale continue d'où destruction progressive des cellules cibles (Helak, 2008).
- **Infection transformante :** Elle est causée par les virus oncogènes. Elle est due à 2 mécanismes (Moussard, 2005) :
 - soit le virus latent intégré dans les chromosomes cellulaires entraîne une transformation de la cellule en cellule cancéreuse.
 - soit la régénération chronique et continue des cellules entraîne une accumulation de mutation de laquelle peut émerger un clone de cellules cancéreuses.

V. Le diagnostic virologique

Le diagnostic virologique repose, comme le diagnostic bactériologique, sur deux approches (Denis, 1999; Huraux et al, 2008) :

- le diagnostic direct, décelant dans les produits biologiques la présence du virus ou de ses composants (antigènes ou génomes viraux),
- le diagnostic indirect, recherchant la réponse immunitaire humorale de l'organisme, et détectant la production d'anticorps circulants spécifiques du virus (Denis, 1999).

Ces deux approches ne s'excluent pas et sont parfois complémentaires.

- **Le diagnostic direct** : (Mammette, 2002)

- Isolement du virus par culture de cellules (l'effet cytopathogène du virus)
- Détection du virus entier par microscopie électronique
- Détection directe des constituants antigéniques du virus
- Détection des génomes viraux (Cf. Figure 3)

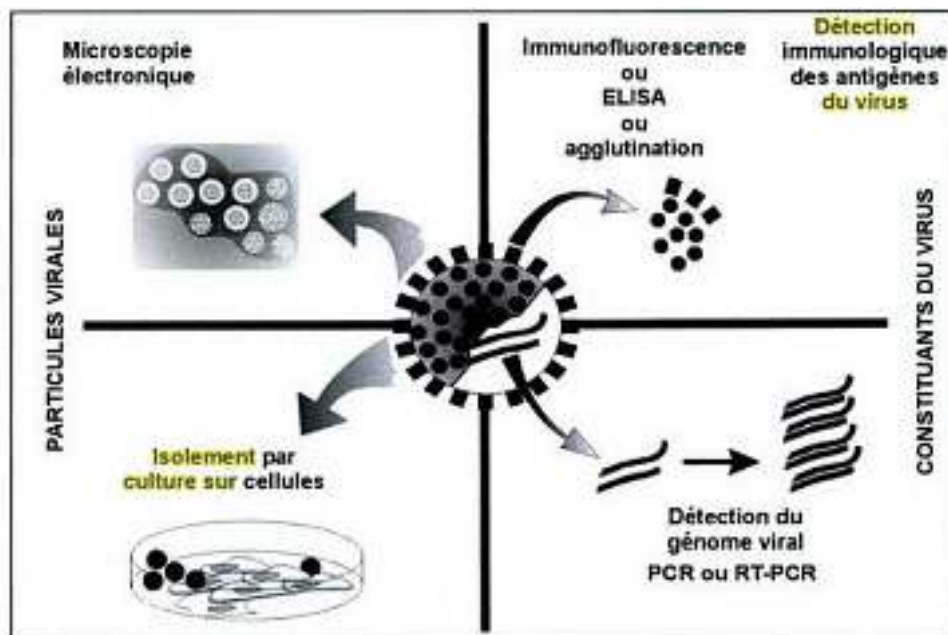


Figure 3 : présentation des quatre groupes de technique de diagnostic en virologie (Mammette, 2002)

- **Le diagnostic indirect** : (Mammette, 2002)

Le diagnostic indirect cherche à mettre en évidence des anticorps synthétisés en réaction à une infection virale. Ces anticorps sont les marqueurs indirects de l'infection. Comme pour toute infection, on distingue :

- les IgM : marqueurs d'une infection aiguë
- les IgG : marqueurs d'une infection passée

CHAPITRE II

LE ROLE DES VIRUS DANS LES MAMMITES

I. Définition

La mammite est l'état inflammatoire d'un ou de plusieurs quartiers de la mamelle qu'elle que soit l'origine traumatique, physique, chimique ou biologique (Schepers, 1997). Cette maladie survient souvent chez les bovins laitiers avec un impact économique énorme pour les producteurs de lait à travers le monde. En raison du nombre élevé de causes inconnues de mammite, des études ont été entreprises afin de mieux connaître le rôle des virus dans cette importante maladie (Wellenberg et al, 2002b).

II. Les virus et les mammites

Certains virus sont incriminés d'intervenir dans l'apparition de mammites de manière :

- Directe : tel que ; le virus herpétique de type 1, le virus herpétique de type 4, le virus de la fièvre aphteuse, le virus Parainfluenza de type 3, et le virus de la leucémie bovine
- Indirecte : tel que ; le virus herpétique de type 2, le virus de la diarrhée virale bovine et le virus de l'immunodéficience bovine

II.1. Les virus intervenant directement dans l'apparition de mammites

II.1. 1. Le virus herpétique de type 1 (BHV1) :

L'herpès virus bovin de type 1, BHV1 (ou virus IBR, infectious bovine rhinotracheitis) appartient au groupe des *Herpesvirus*, famille des *Herpesviridae*, sous-famille des *Alphaherpesvirinae* (Thiry et al, 1999). Sa taille est de 150 à 200 nm (Lange, 1995). C'est un virus à ADN bicaténaire (Pastoret et al, 1978). Il possède un tropisme pour les cellules épithéliales, les cellules mononuclées sanguines et les neurones (Thiry et al, 1999).

• Le BHV1 et les mammites

En 1974, le BHV 1 a été isolé à partir d'une vache atteinte de mammite aux Etats-Unis. Bien que la culture bactérienne était négative et que le BHV-1 a été isolée à partir du lait, la preuve que le virus a causé la mammite, n'est pas significative parce que l'échantillon de lait a été recueilli trois jours après la vaccination avec un vaccin vivant IBR (Roberts et al, 1974).

En France, le BHV-1 a été isolé à partir d'échantillons de lait provenant de vaches atteintes de mammite en combinaison avec *Mycoplasma agalactiae* (Espinasse et al, 1974; Gourlay, 1974).

Un rôle possible de BHV-1 dans l'étiologie de la mammite bovine, sans ou en combinaison avec le virus de la diarrhée virale bovine (BVD), a également été suggéré par SIEGLER et al. (1984), qui décrit une incidence élevée de cas de mammite pour un certain nombre de vaches infectées avec BHV 1 et BVDV.

Dans une autre étude, une inoculation par voie intra-mammaire avec BHV-1 a entraîné une mammite clinique diagnostiquée par une augmentation de la température du corps, une perte d'appétit, les mamelles douloureuses et gonflées, et une forte réduction de la production de lait. Il a été possible d'isoler le virus à partir du lait de quartiers inoculés jusqu'au jour 11 (Straub et Kielwein, 1966).

II.1. 2. Le virus herpétique de type 4 (BHV4)

L'herpèsvirus bovin 4 (BHV4) a été isolé de bovins sains ou atteints de pathologies diverses. Il appartient à la sous-famille des *gammaherpèsvirus*, ce qui le différencie des trois autres *herpèsvirus* bovins qui appartiennent à la sous-famille des *Alphaherpèsvirinae*. Ces derniers sont *l'herpèsvirus* bovin 1 (BHV1), *l'herpèsvirus* bovin 2 (BHV2), et *l'herpèsvirus* bovin 5 (BHV5) (Goriaynooff et al, 2003).

• Le BHV4 et les mammites

Le virus herpétique de type 4 a été isolée à partir d'échantillons de lait de 3 sur 58 vaches avec une mammite clinique (5 %). Deux des trois vaches d'où le BHV-4 a été isolé développent des anticorps contre BHV4, alors qu'aucune augmentation des anticorps contre le BHV4 n'était détectable dans la troisième vache après 21 jours. Un rôle possible de BHV4 dans la mammite bovine était encore étayé par le fait que dans quatre des 10 troupeaux examinés il y avait en cours une infection à la BHV4 en même temps que la survenue de mammites (Wellenberg et al, 2000).

Dans une deuxième étude, une partie du gène du BHV4 (codant pour la glycoprotéine B) a été détecté par PCR dans des échantillons de lait de 2 sur 54 vaches (4%) présentant des mammites (Wellenberg et al, 2001). A partir des mêmes échantillons de lait, le BHV4 a été isolé sur cellules endothéliales du cordon ombilicales, un type de cellule très sensible à l'herpès virus bovins (Wellenberg et al, 2002).

Les inoculations intra-nasale et intra-mammaire simultanées avec le BHV4 permettent de reproduire une mammite subclinique (Wellenberg et al, 2002a). Aux Pays-Bas, le virus a pu être détecté dans 4 % des échantillons de lait issus de 54 vaches atteintes de mammite (Wellenberg et al., 2002b).

Au cours d'une étude épidémiologique, une association positive entre la présence d'anticorps BHV4 chez les vaches et la fréquence de mammite bovine causée par *Staphylococcus aureus* a été enregistrée (Zadoks et al., 2001). Cette découverte suggère qu'une infection de BHV4 précédente favorise le développement de mammite surtout causée par *Staphylococcus aureus*.

II.1. 3. Le virus de la fièvre aphteuse

Le virus de la fièvre aphteuse appartient à la famille des *Picornaviridae* et il est le chef de file du genre *Aphthovirus*. (Holveck, 2002)

• Le virus de la fièvre aphteuse et les mammites

De nombreux chercheurs ont isolé le virus de la fièvre aphteuse à partir de lait de vaches atteintes de fièvre aphteuse (Burrows, 1968; Ray et al, 1989; Fuchs, 1994), et aussi des lésions du trayons et de la mamelle ont été rapportés chez les bovins touchés par la fièvre aphteuse lors d'une épidémie avec *Asia-1 serotype* (Firoozi et al, 1974). Preuve de la réplication du virus de la fièvre aphteuse dans les glandes mammaires, à la suite d'une infection systémique, a été trouvée chez les bovins qui ont été infectés par contact avec des animaux infectés par le virus de la fièvre aphteuse (Blackwell et al, 1983). La réplication du virus de la fièvre aphteuse dans la glande mammaire a également été signalé après que les vaches ont été exposées au virus, soit par aérosol, par une inoculation combinée intra-mammaire et intraveineuse (Blackwell et Yilma, 1981), ou après une inoculation intra-mammaire (Burrows et al., 1971). La capacité du virus de la fièvre aphteuse de persister dans le tissu mammaire a été confirmée par la récupération intermittent du virus à partir des vaches jusqu'au 51 jours, ce qui indique que la multiplication du virus dans les mamelles des vaches immunisées (Burrows et al., 1971).

La mammite associée au virus de la fièvre aphteuse est supposé être dues à des infections bactériennes secondaires. Après une infection des vaches en lactation avec le virus de la fièvre aphteuse, *pyogenes Arcanobacter* ont été isolés à partir de 15 quartiers montrant un début de mammite (Saini et al., 1992), tandis que l'inoculation intra-mammaire de quartiers avec *A. pyogenes* seul ne produit que des réactions inflammatoires bénins (Vecht et al. 1987). Ceci suggère que l'épithélium du trayon des quartiers avait déjà été endommagé par le virus de la

fièvre aphteuse qui a soutenu la participation d'*A. pyogenes* comme l'agent causal de la mammite. La blessure de l'épithélium du trayon était essentielle pour l'établissement de l'infection (Seinhorst et al, 1991).

II.1.4. Le virus Parainfluenza de type 3 (PI3)

Le virus parainfluenza 3 appartient à la famille des Paramyxoviridae, genre Paramyxovirus. Il est enveloppé et les glycoprotéines jouent des rôles majeurs dans le cycle viral infectieux. (Thiry et Douart, 2001).

- **Le PI3 et les mammites**

En 1966, le virus parainfluenza 3 (PI3), a été récupéré de bovins japonais avec une maladie respiratoire aiguë à partir des sécrétions nasales, et aussi du lait (Kawakami et al, 1966a). Une inoculation intra-mammaire de virus PI3 a abouti à des signes respiratoires et d'autres signes, par exemple la fièvre, un malaise, les mêmes signes sont observés chez les veaux infectés par le même virus PI3 par inoculation intraveineuse ou intra-nasale. L'examen histologique a révélé que la plus grande variation est une inflammation interstitielle, uniforme de grandes cellules lymphoïdes (Kawakami et al., 1966b).

II.1.5. Le virus de la leucémie bovine (BLV)

le BLV est un *oncorétrovirus* complexe (Burny et al., 1985; Callahan et al., 1976; Willems et al., 2000). Il appartient à la famille des *deltarétrovirus*.

- **Le BLV et les mammites**

Une association positive des infections BLV et la mammite chez les vaches laitières a été rapporté par Milojevic et al., (1991); Rusov et al., (1994), qui ont déclaré que le risque d'apparition de la mammite est plus augmenté chez les vaches avec leucose que chez les vaches en bonne santé. Une association significative entre le BLV séropositif et un CCS (comptage cellules somatique) de lait supérieur aux normes a également été enregistrée pour des vaches âgées (Jacobs et al. 1995).

Le risque de maladies infectieuses semblait être plus élevé chez les troupeaux infectés par le BLV que chez les troupeaux non infectés par BLV. Dans cette étude, une association positive entre la présence d'anticorps BLV dans le lait de tank et une mammite bovine a été enregistrée (Emanuelson et al. 1992).

Aucune étude expérimentale n'a été réalisée pour déterminer la capacité du BLV à induire des mammites bovine. Ces expériences sont nécessaires afin de mieux connaître le rôle de BLV dans l'étiologie de la mammité.

II. 2. Les virus intervenant indirectement dans l'apparition de mammites

Les lésions du trayon (barrière naturelle) et l'immunosuppression peuvent entraîner une grande sensibilité de la mamelle pour les infections bactériennes, intervenant à leurs tours dans l'apparition des mammites bovine (Wellenberg et al, 2002b).

- **Par les lésions des trayons**

II. 2.1. Le virus herpétique de type 2 (BHV2)

L'agent causal de la Thélite ulcéralive herpétique bovine, dénommée «Bovine herpes mammilitis» par les anglo-saxons, est un virus de la famille des *Herpesviridae*. (Martin et al, 1966 ; Gourreau et Pauluzzi, 1988 ; Pastoret, 1990)

- **Le BHV2 et les mammites**

Herpèsvirus bovin 2 infecte souvent les jeunes vaches dans la première période de lactation. L'infection peut être subclinique (Turner et al., 1976; Letchworth et Ladue, 1982; Scott et Holliman, 1984), mais l'infection peut aussi être très graves causant de graves ulcérations douloureuses sur un ou plusieurs mamelles (Scott et Holliman, 1984). Cela peut augmenter la sensibilité de la glande mammaire pour des bactéries causant les mammites (Martin et al. 1969; Letchworth et Ladue, 1982; Scott et Holliman, 1984; Gourreau et al., 1989). L'infection au BHV2 peut endommager les mécanismes de défense naturels de la mamelle, qui se traduit par une plus grande susceptibilité à la mammité bactérienne (Wellenberg et al, 2002b).

- **Par l'immunosuppression**

II. 2.2. Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV)

Le virus BVDV appartient au genre *Pestivirus* dans la famille des *Flaviviridae*. Dans ce genre, on retrouve le virus de la peste porcine classique et le virus de la Border Disease (Collett et al. 1988 ; Grooms et Waltz, 1997). Le BVDV est un petit virus enveloppé dont le matériel génétique se compose d'un ARN monocaténaire de polarité positive (Grooms et Waltz, 1997). Comme la plupart des virus à ARN, il fait preuve d'une grande variabilité génomique (Potgieter, 1977). Le BVDV peut se présenter in vitro sous deux biotypes appelés cytopathogène (cp) et non-cytopathogène (ncp), selon l'induction ou non d'un effet lytique sur les cultures cellulaires. Il semblerait que la souche cp dérive par mutation de la souche ncp

hébergée par les animaux porteurs asymptomatiques (Pastoret et al, 1983). L'action du virus sur les cellules lymphoïdes conduit à une immuno- dépression (Schelcher et al., 1993).

- **Le BVDV et les mammites**

Les études sur le rôle immunosuppresseur de BVDV par rapport à la mammite bovine sont très rares. Des études ont rapporté des cas de mammite dans les troupeaux BVDV et BHV-1 séropositifs, mais le rôle joué par le BVDV dans ces cas n'est pas clair (Siegler et al . 1984). Une augmentation de nombre de cas de mammites dans les troupeaux en parallèle avec une augmentation du titre d'anticorps de BVDV dans le lait a été rapportée par (Niskanen et al, 1995).

Il n'existe pas de rapports sur l'isolement de BVDV à partir de lait de vaches souffrant de mammites. Cependant, des séquences génomiques du BVDV peuvent être détecté par la PCR a partir des échantillons de lait de tank (Radwan et al., 1995; Drew et al., 1999).

II. 2.3. Le virus de l'immunodéficience bovine (VIB)

Le virus de l'immunodéficience bovine (VIB) est un rétrovirus qui cause une infection à évolution lente. Il est le seul *lentivirus* bovin connu jusqu'à maintenant. La Sous famille des *Lentivirinae* de la famille des *Retroviridae* regroupe des virus similaires au VIB dans les espèces : équine, féline, caprine et ovine et chez les primates. Comme les autres rétrovirus, ces virus sont associés à une forme très particulière de parasitisme puisqu'au cours de leur cycle de multiplication, l'ADN viral, obtenu par mécanisme de transcription inverse à partir de l'ARN génomique, s'insère dans le génome de la cellule infectée. Les cellules cibles du VIB sont les leucocytes (Bouillant et Archambault, 1990; Vander et al, 1990).

- **Le BIV et les mammites**

On observe chez les animaux infectés par le BIV une déplétion lymphoïde avec une réduction de la croissance folliculaire et l'épuisement du compartiment des cellules T et B dans les ganglions lymphatiques, ce qui favorise les infections secondaires multiples telles que les métrites et les mammites (Snider et al., 1996).

Dans une étude, 24 des 59 vaches (40%) infectées avec le VIB ont présenté une mammite chronique. des nécroses du tissu de la glande mammaire ont été enregistrées en association avec un pathogènes de la mamelle comme *Escherichia coli* (Snider et al, 1996).

CHAPITRE III

ISOLEMENT VIRAL SUR CULTURE CELLULAIRE

I. Introduction

Les virus sont des parasites intra-cellulaires obligatoires et leur culture ne peut être obtenue que sur des cellules vivantes. Trois sources de cellules peuvent être utilisées pour le diagnostic virologique : Animaux vivants, Œufs de poule embryonnés et culture cellulaire (Mammette, 2002).

II. L'isolement en culture cellulaire

L'isolement viral en culture cellulaire est une technique qui constitue la base du diagnostic virologique (Mammette, 2002). Elle est fondée sur l'inoculation de cellules en culture par un échantillon biologique potentiellement infecté par un virus. La qualité du prélèvement initial conditionne le résultat de l'isolement en culture cellulaire (Goffard, 2011). Chaque virus possède un tropisme cellulaire propre, donc il n'existe pas de système de culture cellulaire universel, le laboratoire doit entretenir un minimum de deux à trois lignées cellulaires permettant la réplication du plus grand nombre de virus pathogène (Mammette, 2002).

L'isolement d'un virus en culture cellulaire se fait dans des conditions particulières : milieux de culture appropriés, supplémentés ou non, incubation à température variable, en atmosphère humide, etc. (Goffard, 2011). La multiplication virale en culture cellulaire peut se traduire par l'apparition d'un effet cytopathogène. En l'absence d'effet cytopathogène, d'autres outils biologiques sont utilisés pour visualiser la présence du virus dans les cellules en culture. (Goffard, 2011)

III. La culture cellulaire

Selon Mammette (2002), on distingue trois types de culture cellulaire :

- Les cellules primaires : elles consistent en la mise en culture des cellules d'un organe (rein de singe) ou du sang (lymphocytes humains pour la culture des rétrovirus), leur difficulté d'obtention limite leur emploi.
- Les cellules en lignée continue : il s'agit de cellules transformées, donc immortelles ; elles peuvent provenir de tissus d'origine humaine (Hela (human epithelial carcinoma), Kb (human nasopharyngeal carcinoma), Hep-2 (human larynx carcinoma), ou animales (chiens : MDCK, bovins : MDBK, simiennes : vero, et porcine : Pk-15). Elles sont

hétéropleïde. Contrairement aux cellules primaires souvent limitées à une ou deux générations, elles permettent un nombre quasiment infini de subcultures

- Les cellules fibroblastiques embryonnaires humaines : il s'agit de cellules diploïdes qui proviennent habituellement de tissus fœtaux pulmonaires ou rénaux, leur capacité à se multiplier est limitée à environ 40 générations, elles permettent la réplication d'un nombre important de virus pathogènes dans l'espèce humaine.

III.1. Les systèmes de culture cellulaire

Deux systèmes de culture cellulaire sont utilisés pour cultiver des cellules, ils sont essentiellement basés sur l'aptitude des cellules à pousser attachées sur un substrat de verre ou plastique traité (systèmes de culture mono-couche des cellules adhérentes) ou à flotter librement dans le milieu de culture (systèmes de culture des cellules en suspension) (John, 1975).

III.2. Lignée cellulaire

Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules, stables après des mitoses successives, et ayant en théorie une capacité illimitée de division (entretien in vitro par repiquages successifs). Il s'agit en général de cellules cancéreuses, cellules prélevées sur une tumeur au départ, ou cellules rendues immortelles (transformation = cancérisation) par traitement mutagène chimique ou physique ou par utilisation de virus oncogènes (Lewin, 1998).

- prélevées chez un patient (comme les cellules HeLa),
- transformées artificiellement par un virus oncogène (c.à.d. un gène immortalisant tel que l'antigène T du virus simien 40)
- transformées par la mutation des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (comme par exemple la protéine p53).

Dans le présent travail la lignée cellulaire utilisée est les MDBK. Le tableau ci dessous présente des généralités sur la morphologie, le mode de culture et de croissance, le caryotype et les applications de cette lignée cellulaire.

Tableau I : Des données générales sur la lignée MDBK «Madin-Darby bovine kidney »
(Madin et Darby , 1958)

Espèce	Bovine	
Tissu	Rein	
Morphologie	De type épithélial	
Mode de culture	Monocouche	
Mode de croissance	Adhérent (Cf. Figure 4)	
Conditions de la culture cellulaire	Milieu de culture	DMEM ou EMEM
	Sérum	FBS 10%.
	Procédure de Subculture :	Les cellules se détachent du flacon à l'aide de trypsine 0.25% / EDTA 0.02%, la densité de population optimal est de 2.0 à 4.0×10^4 cellules/cm ² .
	Cryoconservation	milieu de croissance, 10% de DMSO.
Caryotype :	2n = 60, la variabilité de l'intervalle entre 40-57 chromosomes, nombre modal de chromosomes 51-53, nombre de marqueurs – 11-14, nombre de cellules polyploïdes 2,0%.	
Autres propriétés	La sensibilité au virus : alphavirus, stomatite vésiculeuse, IBR, BVD, les parvovirus bovin, Bovine adénovirus I et III, le virus parainfluenza 3.	
Applications	virologie.	

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium, **EMEM:** Eagle's minimal essential medium, **FBS:** foetal bovine serum, **EDTA:** Ethylenedinitrilotetraacetic acid **DMSO:** diméthylsulfoxyde, **IBR :** La rhinotrachéite infectieuse bovine, **BVD :** Diarrhée Virale Bovine

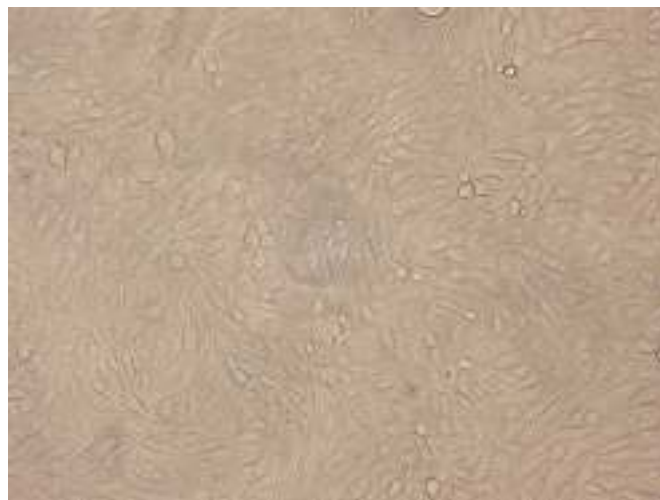


Figure 4 : Nappe cellulaire de la lignée MDBK sous microscope inversé au GRX 40
(Photo originale)

II.3. L'entretien d'une culture de lignée cellulaire

Les cellules doivent être mises en culture dans un milieu dont les caractéristiques physico-chimiques sont les plus proches possible du milieu « naturel » initial dont elles sont issues. (Composition, température oxygénation, lumière, pH...) (Harvey., 2005).

a. Les milieux de culture

Le milieu de culture a pour but de reproduire le plus fidèlement possible les conditions de l'environnement cellulaire *in vivo*, permettant ainsi aux cellules à la fois de survivre mais aussi de se multiplier tout en conservant leurs fonctions cellulaires principales. Selon les milieux cellulaires de base et l'objectif de culture pour lesquels on les utilise, les composants ne seront pas les mêmes. Néanmoins il existe des éléments essentiels qui seront retrouvés dans la plus grande majorité des milieux de bases et qui sont indispensables pour la survie des cellules (Cezard, 2013; Froger et Adolphe, 1988).

Selon Froger et Adolphe, (1988) les éléments essentiels des milieux de bases sont :

- Les constituants minéraux : les ions constituent la base des solutions salines (solution de Hanks ou d'Earle) : sodium, potassium, calcium, magnésium, phosphore, chlore et bicarbonates. Les éléments métalliques sont présents à l'état de trace particulièrement: le Fer, le Cuivre et le Cobalt
- Les substances énergétiques : principalement le D-glucose, le glucide utilisé pour le métabolisme cellulaire énergétique. d'autre substances énergétiques peuvent être utilisées en remplacement comme le mannose, le galactose ou encore le fructose qui possèdent les mêmes propriétés énergétiques que le glucose.
- Les acides aminés : En plus de leur rôle primordial dans la structure et le fonctionnement des cellules, les acides aminés régulent à la fois les systèmes enzymatiques mais aussi le cycle cellulaire.
- Les vitamines : 8 vitamines sont indispensables à la culture cellulaire : La choline, l'acide folique, le pyridoxal, la riboflavine, l'acide nicotinique, la thiamine, l'inositol, et l'acide pantothénique. L'utilisation de la vitamine C et de la vitamine B8, ou biotine, ne sont pas systématiques et dépendent de la nature des cellules en culture.

Les composants du milieu de base sont essentiels pour la croissance et la survie cellulaires, mais pour optimiser ces effets, l'ajout de sérum permet d'apporter des éléments-clés indispensables à la prolifération et au maintien de la différenciation cellulaire.

- **Les sérums**

Classiquement le sérum est additionné au milieu de culture à raison de 10 %, mais certains laboratoires utilisent des concentrations plus élevées de sérum, pouvant monter jusqu'à 20%, pour optimiser la croissance cellulaire (Macleod et Langdon, 2004). Les principaux sérums utilisés sont ceux de veau, de veau nouveau-né et de veau fœtal, bien que du sérum humain et équin soient parfois utilisés. Malgré la composition complexe de ces sérums, des grandes familles de molécules responsables des principales fonctions ont pu être identifiées (Gstraunthaler, 2003) :

- **Molécules stimulant la croissance et les fonctions cellulaires :**

- Les facteurs de croissance : la complexité de leur effets n'est pas encore parfaitement élucidée ceux-ci dépendent énormément de la nature des cellules en culture mais aussi du stade de différenciation de ces cellules. Il faut comprendre ainsi que tous les facteurs de croissances ne peuvent stimuler toutes les cellules, mais ceci n'exclue pas qu'un facteur peut stimuler plusieurs types cellulaires et qu'un type cellulaire peut être stimulé par plusieurs facteurs de croissances. Les principaux facteurs de croissances mis en évidence dans le sérum de veau fœtal sont les FGF (basic fibroblast growth factor), les NGF (nerve growth factor), les IGF-1 (insulin-like growth factor-1) et IGF-2 (insulin-like growth factor-2), EGF (epidermal growth factor) et les PDGF (Platelet-derived growth factor).
- Les hormones : dont le rôle dépend également de la nature des cellules en culture. Selon le type cellulaire nous pouvons retrouver de l'insuline, des glucocorticoïdes, des hormones stéroïdiennes ou encore thyroïdiennes.

- **Composants de la matrice extracellulaire :** fibronectine, glycosaminoglycanes, ou encore collagène, permettant de stimuler l'attachement et la dissémination cellulaire et ainsi la formation d'une monocouche uniforme de cellules avant même qu'il y ait prolifération cellulaire.

- **Protéines de transport :** albumine ou transferrine, assurant ainsi la bonne circulation des molécules de faibles poids moléculaires au sein de la culture cellulaire.

- **Facteurs de stabilisation et de détoxification des milieux de culture :** permettent le maintien d'un pH physiologique ou d'inhiber certaines protéases.

b. Le repiquage par trypsination de la lignée après la confluence (monocouche)

Le repiquage, ou encore "passage", est une technique de culture cellulaire réalisée dès lors que les cellules recouvrent 70 à 90 % de la surface du flacon de culture, ou que le milieu

change de couleur, synonyme d'une acidification et donc d'un appauvrissement en nutriments. (Macleod et Langdon, 2004)

La trypsinisation (ou trypsination) a pour but de décoller les cellules adhérentes au flacon de culture. La trypsine (enzyme protéolytique) détruit certaines protéines de liaison et brise ainsi les liens entre les cellules, sans les altérer. Les cellules sont remises en culture dans du milieu neuf, elles sédimentent, se fixent sur la face traitée du flacon et se multiplient (Macleod et Langdon, 2004)

c. Le stockage d'une lignée cellulaire (la Cryopréservation)

Les cellules sont conservées sous forme congelée à -80°C minimum ou à -180°C dans l'azote liquide. Il est conseillé d'utiliser des systèmes de congélation programmée assurant une diminution de température de 1°C par minute. La congélation est réalisée dans un milieu conservateur constitué du milieu de croissance additionné de 20 à 30% de sérum et de 5 à 10% d'un agent cryoprotecteur : glycérol ou diméthylsulfoxyde (DMSO). Pour une bonne conservation, la concentration cellulaire doit être de 1,5 à 5 millions de cellules par millilitre. La décongélation doit être brutale (Cf. Figure 5) : les cellules sont transférées directement du congélateur au bain-marie à 37°C . L'agent cryoprotecteur, pouvant être toxique à 37°C , est éliminé soit par centrifugation des cellules avant la mise en culture, soit par remplacement du milieu de croissance dès que les cellules adhèrent au support, généralement 1 à 3 heures après la mise en culture. (Thouvenot et al, 2004 ; John, 2004)

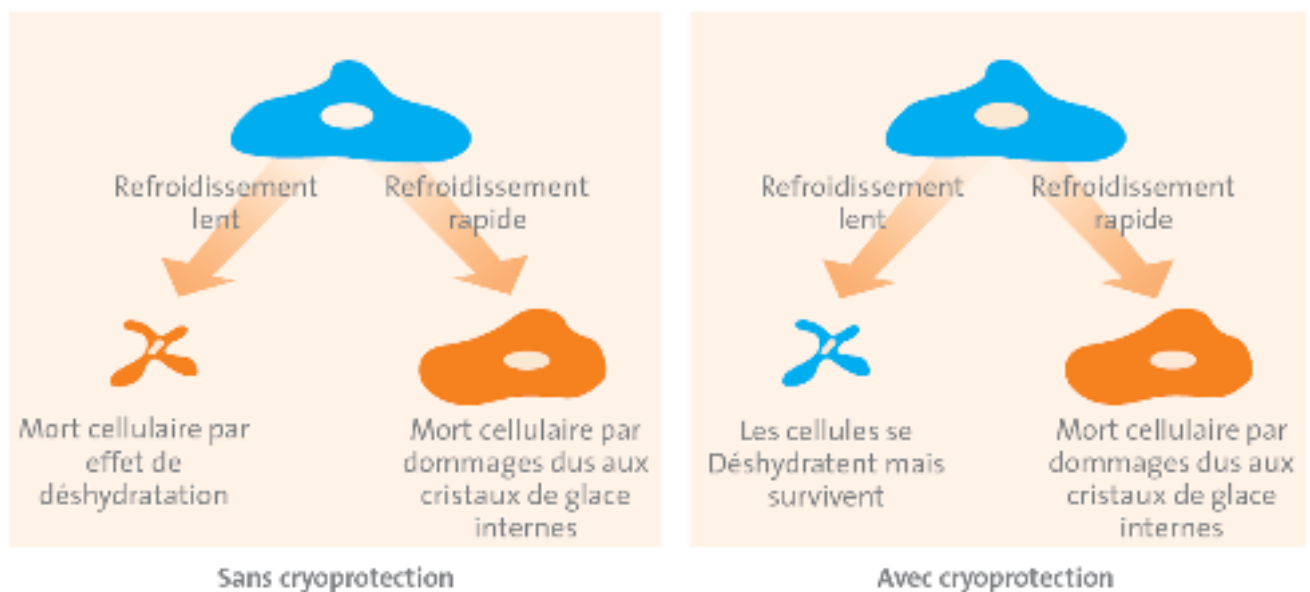


Figure 5. : Effets des vitesses de congélation sur les cellules. (John, 2004)

d. La stérilité de la lignée cellulaire

Le plus souvent, la contamination se perçoit à cause de la turbidité du milieu de la solution d'une part, et de sa couleur d'autre part. Le contaminant (bactérie ou levure) prolifère plus vite que la plupart des cellules de mammifères. Comme il est plus petit, il va flotter dans le milieu, et lui donner un aspect opalescent qu'il ne devrait pas avoir. Par ailleurs, la plupart des milieux de culture incluent un indicateur de pH (le rouge de phénol). Il est rose au départ et vire au rouge lorsque le pH devient basique (présence de levures) tandis qu'il vire au jaune si le pH devient acide (présence de bactéries) (Cf. Figure 6). Enfin, au microscope, les levures sont plus grandes que les bactéries, mais toutes les deux donneront un aspect de "sable" au champ de vision (Cézard, 2013).

La contamination par les mycoplasmes est plus fréquente et insidieuse. Ce sont des bactéries adhérant fortement aux cellules, pouvant provenir d'un composant du milieu ou bien d'un manipulateur. Les mycoplasmes utilisent à leur profit certains composants du milieu, telle l'arginine, ce qui, par carence, provoque une lente dégénérescence des cellules. En outre, leur présence peut inhiber la multiplication des virus. Il est donc indispensable de procéder à un contrôle régulier des cultures cellulaires, cette contamination étant indétectable visuellement. La détection peut se faire par mise en évidence directe ou bien par isolement des mycoplasmes sur des milieux spéciaux (Thouvenot et al., 2004).

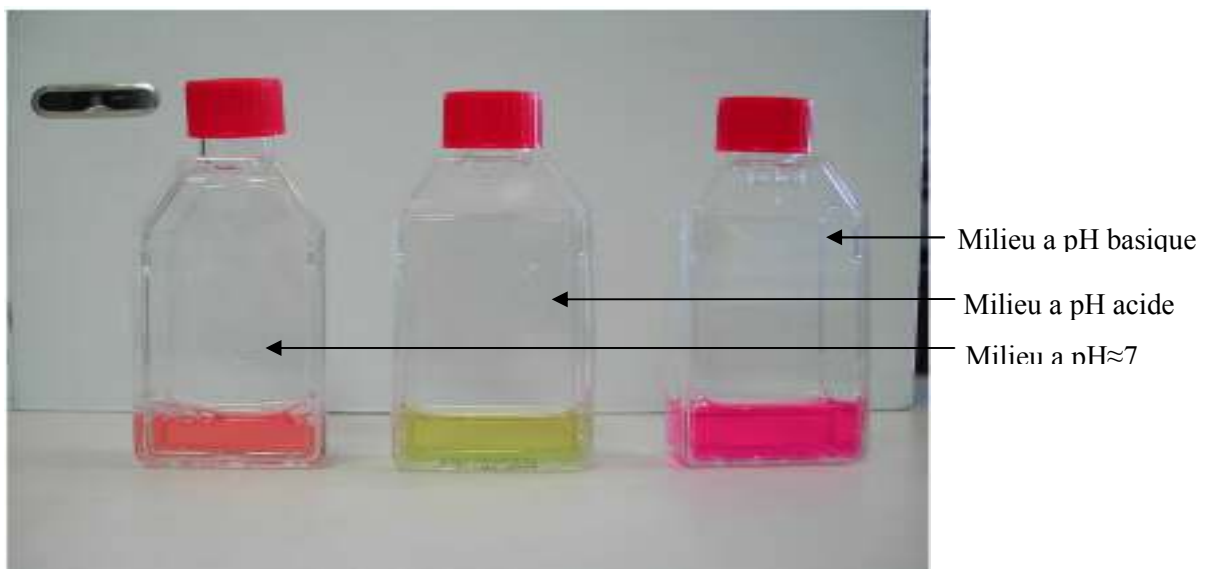


Figure 6 : Virage de l'indicateur de pH suivant l'acidification ou l'alcalinisation du milieu de culture (Thiry 2011)

IV. L'effet cytopathogène (ECP)

Quand un virus est inoculé sur une culture cellulaire, plusieurs éventualités sont possibles :

- Absence de réplication (cellules non permissives).
- Réplication abortive ou faiblement cytolytique n'entraînant aucune modification morphologique des cellules.
- Réplication cytolytique entraînant des altérations morphologiques de la nappe cellulaire, on parle d'effet cytopathogène (ECP) (Mammette, 2002).

L'aspect de l'ECP dépend du système cellulaire, du support de culture, de la concentration de virus et bien sûr, du virus lui-même. Il est souvent caractéristique d'un groupe de virus selon qu'il est localisé ou diffus, à grandes ou petites cellules, plus ou moins réfringentes, arrondies ou irrégulières (Thouvenot et al, 2004)

Les principaux ECP observés consistent en : (Mammette, 2002).

- Des modifications de l'architecture cellulaire générale (arrondissement des cellules, aspect réfringent, augmentation de taille, et détachement du support solide).
- Des modifications de la morphologie cellulaire; formation de cellules géantes polynuclées appelée syncytia résultant de la fusion des membranes cytoplasmiques des cellules infectées, formation de vacuoles intra-cytoplasmiques, destruction nucléaire.
- Des inclusions cytoplasmiques et/ou nucléaires, surtout visibles après colorations cytologiques, correspondant à une accumulation de matériel viral dans la cellule.

Le délai d'apparition de l'ECP est également variable selon les virus : par exemple, l'ECP des poliovirus est visible en 24 à 48 heures, tandis que celui du CMV (cytomégalovirus) n'est généralement détectable qu'à partir de 7 jours de culture. (Thouvenot et al, 2004)

Lorsque l'ECP est discret, peu caractéristique ou absent, on peut être amené à réaliser un ou plusieurs passages, c'est-à-dire une inoculation de la culture initiale à une culture fraîche. De même, si l'on a détecté un virus dans un prélèvement, il est souvent indispensable de procéder à un tel passage pour disposer d'un volume suffisant de matériel infectieux pour des tests complémentaires (identification du virus, sensibilité aux antiviraux, stockage de l'isolat). Il importe d'effectuer ce passage avant que la nappe cellulaire ne soit trop lésée, sous peine de perdre la souche virale. Pour des virus étroitement associés aux cellules, comme le VZV (Le virus varicelle-zona) et le CMV, le passage se fait par trypsination de la nappe cellulaire, pour utiliser comme inoculum une suspension de cellules infectées (Thouvenot et al, 2004).

Exemples d'ECP virale sur les différentes lignées cellulaires

- **Effets cytopathogène, des virus herpès simple** : L'herpès simple virus de type 1 produit la formation de grosses cellules arrondies, souvent groupées initialement en foyers puis envahissant toute la nappe cellulaire, alors que l'ECP du type 2 comporte souvent de petits syncytia. Les ECP des virus herpès simple apparaissent rapidement, en 2 à 4 jours, en cellules Vero. (Thouvenot et al, 2004)

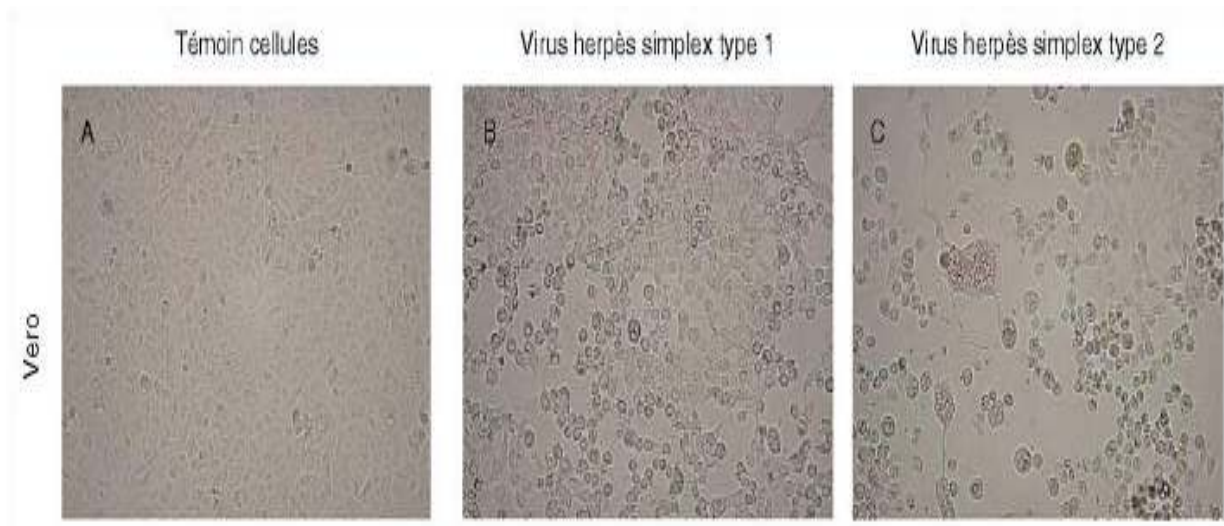


Figure 7 : Effets cytopathogène, observés à l'état frais, des virus herpès simple sur les cellules Vero (Thouvenot et al, 2004)

- **Effets cytopathogène de virus para-influenza** : Les virus grippaux provoquent en MDCK l'apparition de cellules arrondies en foyers, atteignant rapidement toute la nappe cellulaire. L'ECP des virus para-influenza se traduit par des syncytia de tailles variables selon les sérotypes et selon le système cellulaire. (Thouvenot et al, 2004)

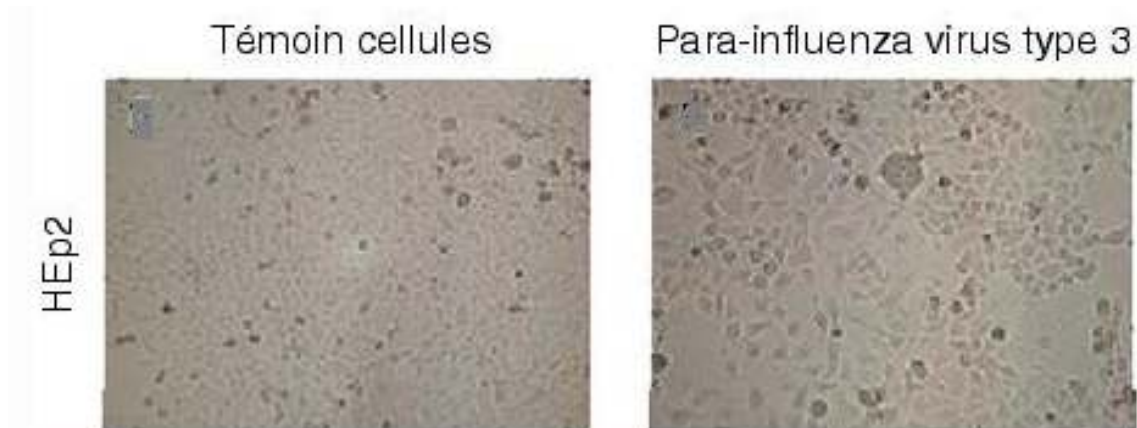


Figure 8 : Effets cytopathogène, observés à l'état frais, du virus para-influenza sur Hep2 (Thouvenot et al, 2004)

- **Effets cytopathogène produits par un adénovirus de type 5 :** Les adénovirus provoquent la formation de grosses cellules rondes, avec généralement, sur lignées continues (HEp2), un aspect en dentelle de la nappe cellulaire, du fait de trous liés à la rétraction du cytoplasme. (Thouvenot et al, 2004)

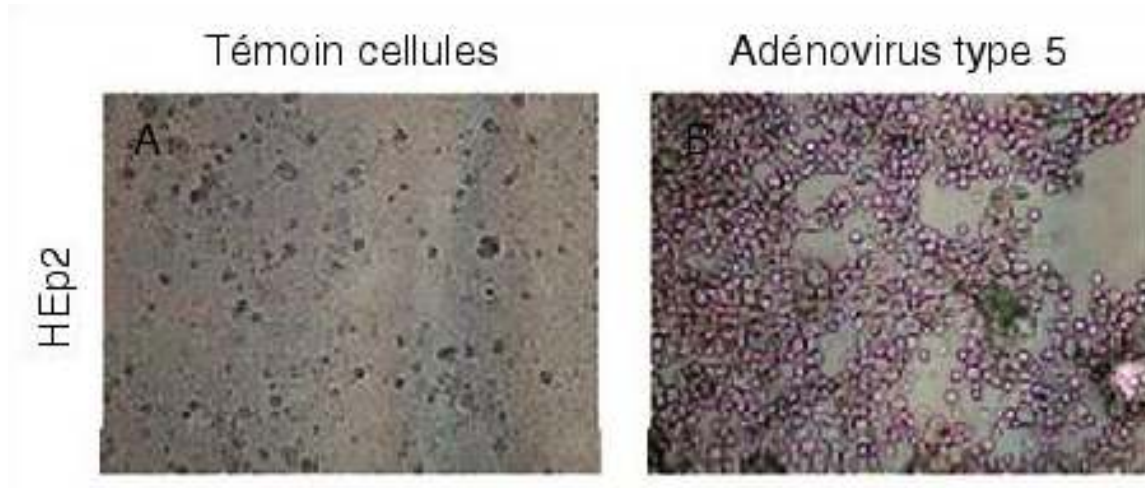


Figure 9 : Effets cytopathogène, observés à l'état frais, produits par un adénovirus de type 5 sur cellules HEp2. (Thouvenot et al, 2004)

partie expérimentale

CHAPITRE IV

MATERIEL ET METHODES

I. Cadre de l'étude :

L'étude s'est déroulée durant la période de mai 2012 à juin 2014. Le travail expérimental a été réalisé au laboratoire de recherche "ECOQUAPA" de la faculté des sciences et de la vie Université Blida 1 et au laboratoire "Grippes et virus respiratoires" de l'institut pasteur d'Algérie (IPA), Annexe Sidi Fredj (Alger).

II. MATERIEL :

II.1. Matériel biologique :

1. Prélèvements:

07 prélèvements de lait ont été obtenus à partir de vaches répartis comme suit :

- 03 prélèvements à partir de vaches saines,
- 04 prélèvements à partir de vaches malades (mammites cliniques et subcliniques)

2. Lignée cellulaire :

Nous avons utilisé dans notre expérimentation la lignée cellulaire MDBK (Cf. figure 10) qui nous a été offerte par le laboratoire PAVAL Lab. Université de Grenoble

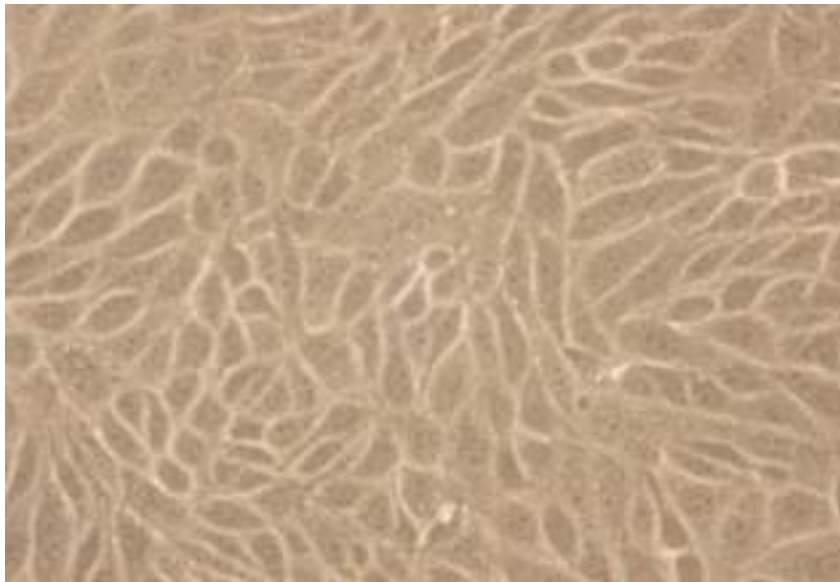


Figure 10 : Une nappe cellulaire (MDBK) au GRX40 (photo originale)

II.2. Matériel non biologique :

1. Milieux et solutions

- Le milieu de culture EMEM : milieu nutritif. La composition de ce milieu (Cf. annexe 1)
- La trypsine /EDTA : solution largement utilisés pour la dissociation des tissus et des monocouches cellulaires. La composition de ce milieu (Cf. annexe 2)
- Le sérum de veau fœtal (SVF) :
- Le tampon phosphate salin (PBS) :
- Le bleu méthylène : colorant
- Le bleu trypan :(ou bleu trypane) colorant utilisé lors de numération cellulaire.
- Le diméthylsulfoxyde (DMSO) : Agent de cryoprotection

.2. Equipement :

Il s'agit des équipements d'un laboratoire de microbiologie (Cf. annexe 3), d'un box culture cellulaire et un box d'inoculation. Les appareils utilisés dans le présent travail sont :

- Hottes à flux laminaire
- Incubateur de marque Memmert
- L'incubateur à CO₂
- Microscope inversé: Le microscope inversé est un microscope optique dont l'échantillon est illuminé par le dessus et observé par en dessous. Ce microscope est beaucoup utilisé pour l'observation de cellules en culture in vitro (Cf. figure 11).



Figure 11 : Microscope inversé (Photo originale)

- Les cellules de numération

- La cellule de MALASSEZ : La cellule de MALASSEZ est un hématicimètre qui permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution. Il s'agit d'une cellule dont le volume mesure 1 mm^3 . Elle comporte 5 bandes horizontales de 4 lignes chacune et 5 bandes verticales de 5 lignes chacune (Cf. figure 12).

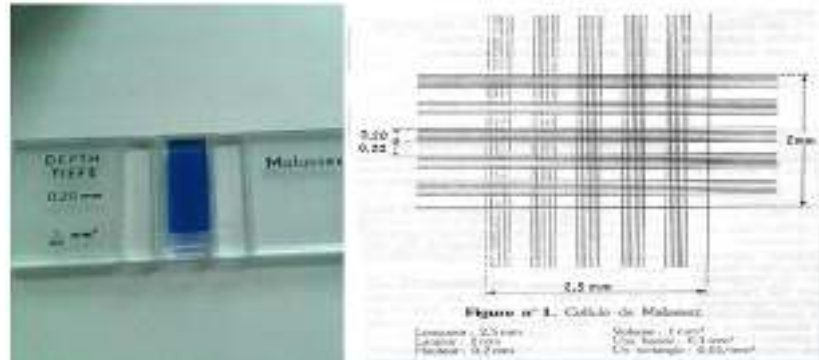


Figure 12 : Cellule de Malassez (Photo originale)

- La cellule de NEUBAUER : La cellule de comptage de NEUBAUER comprend deux surfaces quadrillées de 9 mm^2 chacune. La grille comporte 9 grands carrés de $1 \times 1 \text{ mm}$. Le carré central comprend 25 carrés de $0,2 \times 0,2 \text{ mm}$, subdivisés eux-mêmes en 16 petits carrés de $0,05 \times 0,05 \text{ mm}$. les 4 grands carrés dans les coins sont subdivisés en 16 cases de $0,25 \text{ mm}$. La cellule complète mesure un volume de 1 mm^3 . (Cf. figure 13)

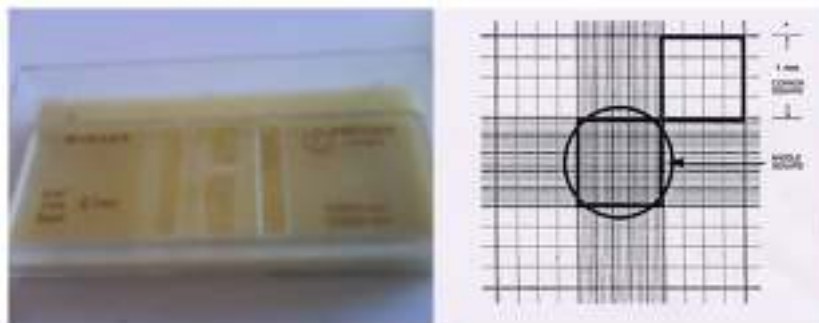


Figure 13 : Cellule de NEUBAUER (Photo originale)

III. METHODES :

Dans la démarche adoptée dans le présent travail pour l'isolement de virus sur lignée cellulaire MDBK. Quatre étapes majeures doivent être respectées :

- a. Le traitement et conservation des échantillons de lait
- b. Le maintien de la lignée cellulaire MDBK
- c. L'inoculation
- d. Lecture des nappes cellulaire

III.1. Le traitement et conservation des échantillons de lait

Les échantillons de lait ont été traités dans le but d'obtenir des surnageant pour les particules virales libres et des culots pour les particules virales intra cellulaires.

- **Pour l'obtention des surnageant**

- Centrifuger 3 ml de chaque prélèvement à 3000 rpm pendant 5 min à température +4°C
- Récupérer le surnageant
- Ajouter 8 gouttes de BSA (bovin serum albumin)
- Congeler à -80°C

- **Pour l'obtention des culots cellulaire (numération cellulaire)**

Pour l'obtention d'un culot de concentration de 2.10^6 cellules/ml, il faut réaliser une numération cellulaire sur cellule de Malassez selon les étapes suivantes :

- Mettre 18 gouttes d'eau physiologique dans un tube conique
- Ajouter 2 gouttes du prélèvement de lait
- Ajouter une goutte du bleu méthylène
- Homogénéiser le prélèvement à l'aide d'une pipette pasteur, puis prélever une petite quantité.
- Amener l'extrémité de la pipette inclinée au niveau de l'espace situé entre la plate-forme et la lamelle: l'hématimètre (cellule Malessez) se remplit immédiatement par capillarité (Cf. figure 14)
- Laisser sédimenter pendant 5 à 10 minutes sur un plan bien horizontal.
- Après repérage des limites de la cellule à l'objectif X10, les éléments (cellules somatique) sont comptés à l'objectif X40 (Cf. figure 14).
- La concentration des cellules est calculée selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Cellules comptées}}{\text{Nombre de carreaux}} \times 10 \times 10^4 = \text{Cellules / ml}$$

- Calculer le volume à mettre pour obtenir la concentration de 2.10^6 cellules/ml dans les tubes coniques en utilisant la formule suivante

$$v = \frac{2.10^6}{\text{la concentration}}$$

- Mettre le volume nécessaire de lait dans des tubes coniques de 5 ml
- Laver en ajoutant 200µl de PBS et récupérer le culot après centrifugation à 3000 rpm pendant 5 min à une température de +4°C
- Refaire cette opération deux fois de suite.
- Récupérer le culot
- Ajouter au culot 100µl de PBS
- Ajouter 810 µl de SVF
- Ajouter goutte à goutte 90 µl de DMSO
- Congeler à -80°C



Figure 14 : Remplissage et comptage cellulaire avec une cellule Malassez sous microscope optique (Photo originale)

II.2. Le maintien de la lignée cellulaire MDBK

- Récupérer le cryotube stocké dans l'azote liquide
- Réaliser une décongélation rapide dans le bain marie à 37°C
- Aspirer et refouler délicatement la suspension pour disperser les cellules afin d'assurer un comptage exacte et une croissance uniforme lors des passages.
- Compter les cellules sous un microscope inversé : prendre 50 µl de la suspension et 50 µl du bleu trypan, aspirer et refouler puis mettre sur la cellule NEUBAUER (Cf. figure 15)
- Calculer la concentration cellulaire avec la formule suivante :

$$\frac{\text{Cellules comptées}}{\text{Nombre de carreaux}} \times 2 \times 10^4 = \text{Cellules / ml}$$



Figure 15 : la cellule NEUBAUER et comptage cellulaire sous un microscope inversé
(Photo originale)

- Mettre la suspension dans un flacon déjà préparé avec milieu de décongélation (5 ml d'EMEM et 30% de SVF) pour rafraichir les cellules
- Aspirer et refouler puis incuber à 37°C et à 5% CO₂ pendant 4h
- Observer l'adhérence et la viabilité des cellules avec le microscope inverse (Cf. figure 16)
- Après adhérence des cellules (24h à 48h), changer le milieu (5 ml d'EMEM et 10% de SVF) et incuber à 37°C et à 5% CO₂ jusqu'à confluence
- Evaluer le degré de confluence de la culture cellulaire et confirmer l'absence de contamination bactérienne et fongique par microscope inversé.
- Préchauffer le milieu de culture EMEM et la trypsine/EDTA à 37°C
- Eliminer le milieu de culture déjà présent avec une pipette stérile et rincer la couche cellulaire avec 5 ml de trypsine/EDTA.
- Répéter trois fois cette étape de rinçage et ensuite aspirer la trypsine/EDTA
- Ajouter 3 ml de trypsine/EDTA sur la nappe cellulaire et distribuer sur toute la surface du flacon
- Incuber à 37°C pendant 5-10 mn
- Examiner avec un microscope inversé pour s'assurer que toutes les cellules sont détachées
- Ajouter 27 ml d'EMEM et 10% SVF. (Cf. figure 17)
- Aspirer et refouler délicatement la suspension pour disperser les cellules afin d'assurer un comptage exacte et une croissance uniforme lors des passages.
- Prendre 50 µl de la suspension et 50 µl du bleu trypan, (dilution 1/2)
- Aspirer et refouler puis mettre sur la cellule de NEUBAUER

- Compter les cellules sous un microscope inversé et définir la concentration selon la formule précédente (Cf. figure 15)
- Proposer des densités cellulaires à ensemercer pour l'obtention d'une nappe confluyente dans une durée de temps précise c'est **L'optimisation de la densité cellulaire a ensemençé:**
 - Ensemercer les flacons de 25 cm² avec le volume correspondant aux différentes densités cellulaires (4.10⁴, 9.10⁴, 12.10⁴, 14.10⁴ cellules/cm²) selon la formule suivante

$$v = \frac{\text{la densité a obtenir} \times \text{la surface du flaçon}}{\text{la concentration}}$$
 - Incubé à 37°C et observer sous microscope inversé chaque jour pendant 7 jours
 - Marquer le pourcentage du degré de la confluence de la nappe cellulaire chaque jour pour chaque densité [le degré de confluence est mesuré subjectivement par l'opérateur humain sous microscope inversé au GR X40 (Dai Fei et al. 2011)].
- Faire le choix de la densité à ensemercer pour le maintient et l'inoculation
- Prendre le volume nécessaire de la suspension pour avoir la densité de 9.10⁴ cellules/cm² le volume est obtenu par la formule suivante
- Ajouter le volume nécessaire d'EMEM et 10% SVF à la suspension afin d'avoir 30 ml dans les flacons de 75 cm²
- Incuber 3 jours à une température de 37°C.
- Refaire les mêmes étapes à partir de la trypsination à chaque fois qu'il y a confluence (repiquage)



Figure16 : Observation avec le microscope inverse
(Photo originale)



Figure 17 : Ajouter d'EMEM (Photo originale)

III.3. L'inoculation

- Evaluer le degré de confluence de la culture cellulaire et confirmer l'absence de contamination bactérienne et fongique par microscope inversé.
- Préchauffer le milieu de culture EMEM et la trypsine/EDTA à 37°C
- Eliminer le milieu de culture déjà présent avec une pipette stérile et rincer la couche cellulaire avec 5 ml de trypsine/EDTA.
- Répéter trois fois cette étape de rinçage et ensuite aspirer la trypsine/EDTA
- Ajouter 3 ml de trypsine /EDTA sur la nappe cellulaire et distribuer sur toute la surface du flacon
- Incuber pendant 5-10 mnt a 37°C
- Examiner avec un microscope inversé pour s'assurer que toutes les cellules sont détachées
- Ajouter 27 ml d'EMEM et 10% SVF. Aspirer et refouler délicatement la suspension pour disperser les cellules afin d'assurer un comptage exacte et une croissance uniforme lors des passages.
- prendre 50 µl de la suspension et 50 µl du bleu trypan, (dilution 1/2)
- aspirer et refouler puis mettre sur la cellule NEUBAUER
- Compter les cellules sous un microscope inversé et calculer la concentration cellulaire
- Prendre le volume nécessaire de la suspension pour avoir la concentration de 14.10^4 cellules/cm²
- Ajouter le volume nécessaire d'EMEM et 10% SVF a la suspension à fin d'avoir 5 ml dans les flacons de 25 cm²
- Incuber à 37C° dans une atmosphère à5% de CO₂ pendant 24 heures
- Préparer les échantillons pour l'inoculation
 - Décongeler les échantillons stockés à -80°C, lentement dans la glace
 - Traiter à 0,2% d'antibiotique «pénicilline 10000 unité + 10mg streptomycine/ml » pendant 15 mn
 - Ajouter 5 ml d'EMEM et 4% SVF et incuber à 37°C pendant 4 heures
 - Centrifuger 3000 rpm pendant 5 minutes et récupérer le surnageant
- Préparer les flacons de 25 cm²
 - Aspirer l'EMEM et 10% SVF déjà présent dans les flacons de 25cm²
 - Rincer avec 6 ml d'EMEM sans SVF, aspirer à nouveau le milieu
- Injecter 500 µl de chaque échantillon dans un flacon différent
- Mettre dans le flacon du témoin négatif 1 ml d'EMEM et 4% de SVF

- Incuber à 37C° dans une atmosphère à5% de CO₂ pendant 1 heure
- Aspirer l'EMEM du flacon témoin
- Ajouter à chaque flacon 5 ml d'EMEM et4% de SVF
- Incuber à 37C° dans une atmosphère à5% de CO₂

III.4. Lecture des nappes cellulaire

Commencer l'observation des flacons incubés à partir de 48 heures jusqu'au septième jour d'incubation

- En cas de contamination (bactéries, levures, champignons, ou mycoplasmes) un autre passage doit être effectué avec l'inoculum récupéré après les étapes suivantes :
 - Dès que la contamination survient on arrête l'incubation du flacon
 - Congeler et décongeler le flacon souillé 3 fois
 - Centrifuger à 3000 rpm pendant 5 minutes
 - Filtrer le surnageant avec un filtre à 0.22µm de porosité
 - injecter la suspension filtrée dans un nouveau flacon préparé
 - Incuber à 37C° dans une atmosphère à5% de CO₂ pendant 1 heure
 - Ajouter 5 ml d'EMEM avec 4% SVF
 - Incuber à 37C° dans une atmosphère à5% de CO₂ de 48h a 7jours
- En cas d'absence d'ECP après le septième jour d'incubation, un deuxième passage est effectué en suivant les étapes ci-dessous :
 - Réaliser trois cycles de congélation décongélant des flacons qui ne représentent pas d'ECP
 - Centrifuger à 3000 rpm pendant 5 minutes
 - Récupérer le surnageant
 - Injecter le surnageant récupéré dans un nouveau flacon préparé
 - Incuber à 37C° dans une atmosphère à5% de CO₂ pendant 1 heure
 - Ajouter 5 ml d'EMEM avec 4% SVF
 - Incuber à 37C° dans une atmosphère à5% de CO₂ de 48h a 7jours
- En cas de présence d'ECP on conserve les flacons pour des études ultérieurs

CHAPITRE V

RESULTATS ET DISCUSSION

Les échantillons de lait ont été traités dans le but d'obtenir des surnageant pour les particules virales libres et des culots pour les particules virales intra cellulaires, inoculées sur une lignée cellulaire MDBK maintenue

I. Le traitement des échantillons de lait Pour l'obtention des culots cellulaire (numération cellulaire)

Les résultats des numérations cellulaires obtenues à partir des sept (7) laits de vaches analysés et les volumes à centrifuger pour l'obtention d'un culot d'une concentration de 2.10^6 cellules/ml sont rapportés dans le tableau II

Tableau II : Résultats de la numération cellulaire obtenu à partir des 7 vaches analysés et les volumes à centrifuger pour l'obtention du culot

N° prélèvement	Comptage cellulaire (cellules/ml)	Le volume a centrifugé
01	17.10^5	1176.47 μ l
02	90.10^5	222.22 μ l
03	14.10^5	1429 μ l
04	9.10^5	2222.22 μ l
05	4.10^5	5000 μ l
06	3.10^5	6666.66 μ l
07	3.10^5	6666.66 μ l

Il en ressort que

- Quatre (04) vaches ont présentés une numération cellulaire supérieure à 5.10^5
- Trois (03) vaches ont présentés une numération cellulaire inférieure à 5.10^5

Discussion

Les résultats du comptage cellulaire révèlent une numération cellulaire supérieure ou égale à 9.10^5 cellules/ml pour les prélèvements (01, 02, 03 et 04) correspondent à ceux récupéré de vaches atteintes de mammites clinique ou sub-clinique. Contrairement aux prélèvements (05, 06 et 07) récupéré de vaches saines dans lesquels nous avons obtenu une numération cellulaire inférieure à 4.10^5 cellules/ml. Ces résultats confirment bien le statut sanitaire (sain

ou malade) dépistées au moyen du california mastitis test (CMT). Cette évaluation du statut sanitaire des vaches a été réalisée selon l'interprétation de Berthelot et al (1987) à savoir :

- Le lot des vaches saines ayant présentée un test CMT -, correspondant a une numération $CCS < 500 \times 10^3$ cellules / ml.
- Le lot des vaches atteinte de mammite subclinique ayant présentée un test CMT+/++, correspondant a une numération compromise dans l'intervalle $5 \times 10^5 < CCS < 500 \times 10^5$ cellules / ml.
- Le lot des vaches atteintes de mammite clinique ayant présenté un test CMT+++ correspondant a une numération $CCS \geq 500 \times 10^5$ cellules/ ml.

Les Concentrations Cellulaires (CC) du lait sont des indicateurs de l'état sanitaire du troupeau, de la vache ou du quartier (Poutrel., 1985). En effet, les cellules du lait sont essentiellement constituées de leucocytes dont le nombre augmente considérablement en cas d'infection de la mamelle.

le comptage cellualre nous a permis de determiner la concentration des cellules somatiques dans nos prélèvements, et ainsi connaitre le volume de lait a cenrifugé pour avoir un culot avec 2.10^6 cellules/ml. Ce culot a été cryoconservé jusqu'au moment ou les cellules doivent etre lyser pour liberer les éventuelles pathogenes viraux, que peuvent contenire ces cellules du système immunitaire.

II. Le maintien de la lignée cellulaire MDBK

- **L'optimisation de la densité cellulaire à ensemercer**

Pour l'optimisation des densités, nous avons proposé différentes densités cellulaires à ensemercer sur des flacons de 25 cm² pour lesquels nous avons évalué le degré de confluence pendant sept jours sur la totalité de la surface du flacon. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III

Tableau III : Les résultats de l'optimisation de la densité cellulaire à ensemercer

Densité cellulaire (10 ⁴ cell/cm ²)	Durée incubation						
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
4	20%	40%	70%	80%	*	*	90%
9	60%	80%	90%	95%	*	*	99%
12	80%	95%	99%	99%	*	*	S
14	90%	95%	99%	99% S	*	*	S

* : aucune observation « journées de week-end », S : milieu de culture épuisé et souffrance cellulaire

Il en ressort que :

- Avec l'ensemencement d'une densité de 4.10⁴ cell/cm² la nappe cellulaire atteint une confluence de 80% au J4 et une confluence de 90% au J7
- Avec l'ensemencement d'une densité de 9.10⁴ cell/cm² la confluence est à 80% au J2 à J3 la confluence est de 90%, au J7 le flacon est complètement occupé par les cellules c'est une confluence cellulaire à 99% (phase stationnaire) et le début de la souffrance cellulaire.
- l'ensemencement à une densité de 12.10⁴cell/cm² nous a donné une confluence de 80% au J1 et à partir de j4 la confluence observée est de 99% avec souffrance cellulaire
- l'ensemencement à une densité de 14.10⁴ cell/cm² nous donne une confluence de 90% au J1 au j2 la nappe est complètement confluite estimée à 95-99% avec souffrance cellulaire.

Discussion

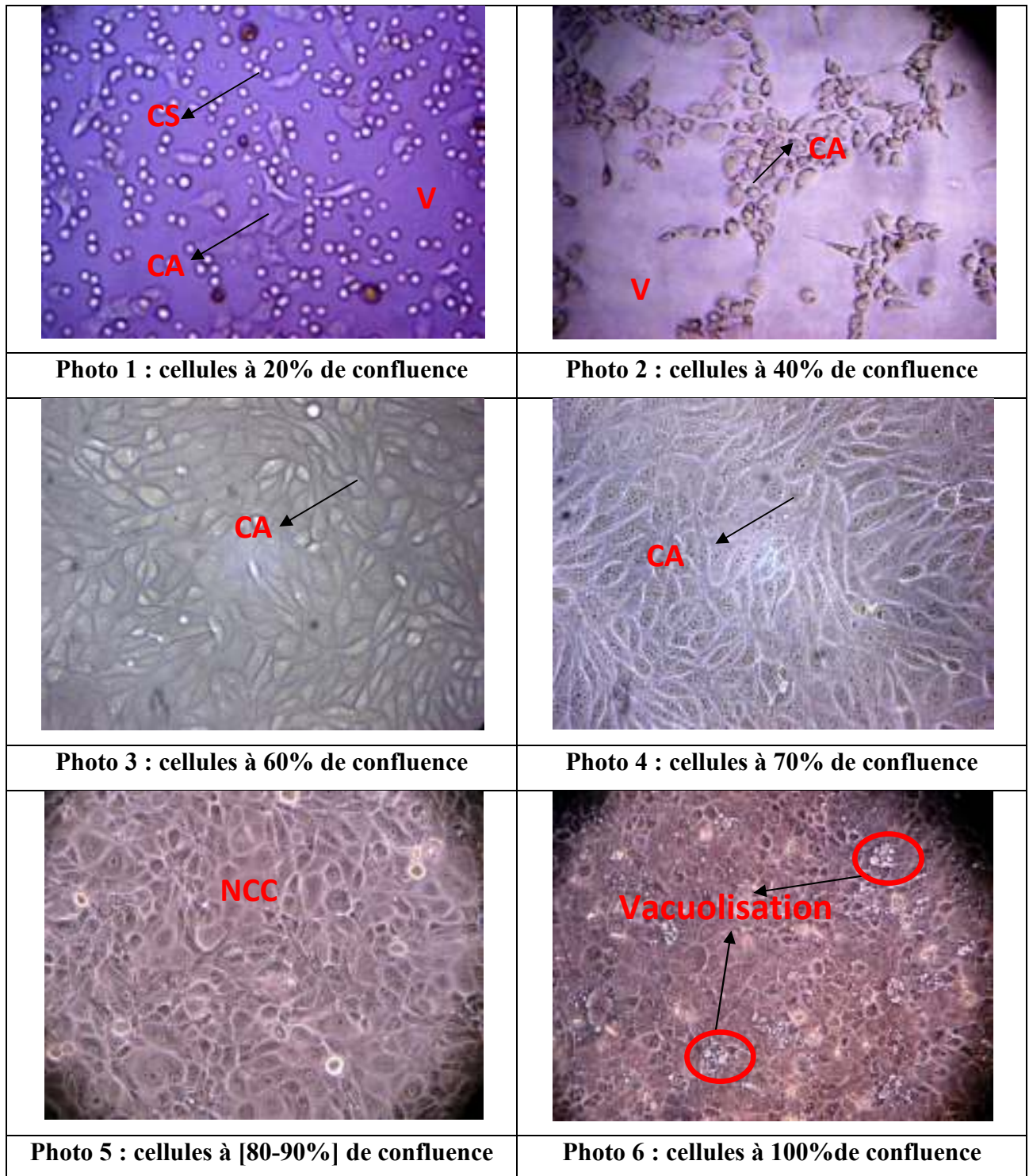
D'après les résultats de l'observation du comportement de la lignée MDBK pour chaque densité d'ensemencement nous remarquons que plus la densité d'ensemencement initiale est élevée plus la confluence de la nappe cellulaire est observée plus rapidement. La confluence à 95% est observée à J4 pour une densité de 4.10^4 cell/cm² alors qu'elle est de 95% à J2 pour les densités de 12^4 et 14^4 cell/cm². Ces résultats nous permettent de choisir la densité qu'il faut pour chaque étape de notre travail

Ces degrés de confluence sont ont relation avec la cinétique de la croissance cellulaire qui passe par trois phases : La phase d'adaptation, la phase exponentielle et la phase stationnaire (Michael., 2006).

Selon ces phases nous avons réalisé une interprétation pour chaque degré de confluence

- Phase d'adaptation : les cellules s'adaptent au milieu ce qui correspond à une confluence de [20-40%] où on peut observer des cellules qui adhèrent (CA) à la surface du flacon et d'autres qui sont encore en suspension (CS) et une surface de flacon pas complètement recouverte présence de vide (V) (Cf. Photos 1 et 2 figure 18)
- Phase exponentielle : c'est la division cellulaire, elle correspond à une confluence de [60-70%] ou on peut observer une multiplication des cellules qui ont un aspect allonger et qui adhèrent et recouvrent presque la totalité de la surface du flacon (Cf. Photos 3 et 4 figure 18)
- Phase stationnaire : diminution de la vitesse ou l'arrêt de la prolifération à cause de l'épuisement du milieu de culture la nappe cellulaire atteint la confluence de [85-90%] (Cf. Photo 5 figure 18)

Après l'observation de la phase stationnaire et avant le début d'une souffrance cellulaire, un repiquage par typsination doit s'effectuer pour éviter l'autophagie stimulée en conditions de stress (carence en nutriments, hypoxie..), du a la surpopulation de la nappe cellulaire (Sun et Peng, 2009). Cette souffrance cellulaire est caractérisée par la présence d'une importante vacuolisation dans le cytoplasme (Cf. Photo 6 figure 18) l'absence d'une condensation de la chromatine et une fragmentation du noyau, et une dilatation mitochondriale



CS : cellules en suspension, CA : cellules adhérentes, V : vide, NCC : nappe cellulaire confluyente

Figure 18 : les différents degrés de confluence d'une nappe cellulaire MDBK
(Photo originale)

La durée de ces phases dépend du type cellulaire et des conditions de l'environnement tel que le milieu de culture et la température d'incubation et aussi la densité initiale d'ensemencement.

A partir de ce qui a été présenté nous avons fait un choix de densité initiale à ensemercer pour l'inoculation et le maintien et l'entretien de la lignée cellulaire

Pour l'inoculation : notre lignée cellulaire doit être jeune et fraîche de 24h et à une confluence de [85-90%] pour nous assure une bonne observation des lacunes et des changements morphologiques des cellules s'il y'a présence d'ECP. Donc notre choix a porté sur la densité de 14.10^4 cell/cm²

Pour l'entretien de la lignée et son maintien : la densité a ensemercé est choisie a fin de programmé les intervalles de repiquage pour éviter de faire plusieurs trypsinations par semaine et par cela diminuer les risques de contamination dû a la manipulation et économiser les réactifs (milieu de culture SVF et trypsine / EDTA) et éviter aussi d'atteindre la phase stationnaire dans les journées de weekend. Donc notre choix a porté sur la densité de 9.10^4 cell/cm²

Ces choix de confluence pour l'inoculation sont confortés par les travaux de L'haridon et Scherrer (1976) dans leurs travaux sur la culture in vitro du rotavirus ont obtenu les meilleurs résultats lorsque les cellules sont infectées au moment où les tapis deviennent confluent.

L'haridon et al. (1981) les cultures cellulaires n'ont pas été utilisées avant d'atteindre la confluence. Aurelia et al. (2000), ont choisi une confluence à 90% avant d'infecté les cellules MDBK et VERO avec les virus de Bovine parainfluenza virus type 3 (bPIV3) et human PIV3 (hPIV3).

Autre que la densité initiale d'ensemencement notre lignée cellulaire MDBK a été ensemercé dans le milieu de culture EMEM supplémenté en SVF 10% et incubé a 37°C de température et une atmosphère a 5% de CO₂

Plusieurs cultures cellulaires sont entretenues dans ces même conditions tel que : BHK-21 (Baby Hamster Kidney) dans les travaux de Mengesha et al (2014) et la lignée cellulaire du rein de singe dans les travaux de Govinda et Visvesvara (2002).

II. L'inoculation et la lecture des nappes cellulaires

Après l'inoculation des nappes cellulaires confluentes avec nos prélèvements, les résultats des observations obtenus sont présentés dans le tableau IX

Tableau IX : les résultats de l'inoculation des cellules MDBK par les prélèvements

les observations les prélèvements		Le premier passage P01				Le deuxième passage P02				le troisième passage P03			
		48h	72h	Jour 5	Jour 7	48h	72h	Jour 5	Jour 7	48h	72h	Jour 5	Jour 7
1	Culot	NCC	NCC	NCS	*	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC
	Surnageant	NCC	LC	NCS	*	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC
2	Culot	NCC	LC	NCS	*	NCC	LC	NCS	*	NCC	ECP+	ECP+	/
	Surnageant	NCC	LC	NCS	*	NCC	LC	NCS	*	NCC	ECP+	ECP+	/
3	Culot	NCC	NCC	NCC	S	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	S
	Surnageant	NCC	NCC	NCC	S	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	S
4	Culot	NCS	*	*	*	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	S
	Surnageant	NCS	*	*	*	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	S
5	Culot	NCC	NCC	NCC	S	NCC	NCS	*	*	NCC	NCC	NCC	NCC
	Surnageant	NCC	NCC	NCC	S	NCC	NCS	*	*	NCC	NCC	NCC	NCC
6	Culot	NCS	*	*	*	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC
	Surnageant	NCS	*	*	*	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC
7	Culot	NCS	*	*	*	NCC	NCC	NCC	S	NCC	NCC	NCC	S
	Surnageant	NCS	*	*	*	NCC	NCC	NCC	S	NCC	NCC	NCC	S
T		NCC	NCC	NCC	S	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC	S

T : le flacon témoin. NCC : nappe cellulaire confluyente. LC : lyse cellulaire. NCS : nappe cellulaire souillée. ECP : un effet cytoplasmique. S : souffrance cellulaire. * : arrêt de l'incubation.

La lecture à T48h, T72h J5 et J7 se fait toujours par rapport au témoin pour comparer les éventuels changements cytologiques. L'observation des effets cytopathogènes au microscope est poursuivie jusqu'à la destruction quasi complète du tapis cellulaire.

Il en ressort :

- Au premier passage p01 à :
 - 48h : la nappe cellulaire est confluite (NCC) dans le témoin négatif ainsi que dans les prélèvements 1, 2, 3 et 5. Les nappes cellulaires inoculées avec les prélèvements 4, 6 et 7 ont été souillées (NCS) l'incubation est arrêtée (*) et un deuxième passage est nécessaire.
 - 72h : la nappe cellulaire est confluite dans le témoin. Alors que les nappes cellulaires inoculées avec le surnageant du prélèvement 1, les surnageant et culot du prélèvement 2 ont commencé à présenter une lyse et un détachement cellulaire (LC). Les autres nappes restent confluentes.
 - Jour 5 : la nappe cellulaire est confluite dans le témoin. les nappes cellulaires inoculées avec les prélèvements 1 et 2 ont été souillées.
 - Jour 7 : la dernière journée d'incubation, la nappe cellulaire dans le témoin présente une souffrance cellulaire (S) ainsi que les nappes cellulaires inoculées avec les prélèvements 3 et 5
- Au deuxième passage p02 :
 - 48h : Les nappes cellulaires dans tous les flacons sont restées confluentes
 - 72h : La nappe cellulaire du flacon témoin et les nappes cellulaires des flacons inoculés avec les prélèvements ; 1, 3, 4,6 et 7 sont confluentes. Les flacons inoculés avec le prélèvement 5 ont présentés une nappe cellulaire souillée. Les nappes cellulaires inoculées avec le prélèvement 2 ont commencé à présenter une lyse cellulaire.
 - jour 5 : La nappe cellulaire du flacon témoin et des flacons inoculés avec les prélèvements 1, 2, 3, 4, 6 et 7 sont confluentes. La nappe cellulaire inoculée avec le prélèvement 2 est souillée
 - jour 7 : le prélèvement 7 présente une souffrance cellulaire. Les autres nappes restent confluentes.
- Au troisième passage P03 :
 - 48h : Les nappes cellulaires sont restées confluentes dans tous les flacons incubés.
 - 72h : Les nappes cellulaires sont restées confluentes dans tous les flacons, sauf pour les flacons inoculés avec le prélèvement 2 (culot et surnageant) où l'apparition d'un ECP a commencé à être observé

- jour 5: La nappe cellulaire du flacon témoin ainsi que les nappes cellulaires des flacons inoculés avec les prélèvements ; 1, 3, 4, 5, 6 et 7 sont confluentes. Alors que l'ECP a continué son développement sur les nappes cellulaires des flacons inoculée avec le culot et le surnageant du prélèvement 2 ce prélèvement est considéré ECP positif ; l'incubation est arrêté a fin de stocker le prélèvement pour les études à venir
- jour 7 : Le début d'une souffrance cellulaire à commencer à être observer dans le flacon témoin et les flacons inoculés avec les prélèvements ; 3, 4, 5 et 7. Les nappes cellulaires sont confluentes dans les flacons inoculés avec les prélèvements ; 1, 5 et 6.

L'interprétation de ces observations a donnée les résultats rapportés dans le tableau suivant

Tableau X : L'interprétation en chiffres des résultats de l'isolement viral

	Effet cytopathogène (ECP)			
	Présence		absence	
	n	%	n	%
Culots (n=7)	1	14,28	6	85,71
Surnageant (n=7)	1	14,28	6	85,71
Total	2	14,28	12	85,71

Discussion :

Dans le présent travail le diagnostic des infections virales a été réalisé par isolement sur une culture cellulaire dans le but de mettre en évidence la présence d'agents pathogènes viraux mixtes mais aussi d'amplifier (ou cultiver) les virus.

Le choix de la lignée cellulaire pour l'isolement dépend de la sensibilité et susceptibilité de la lignée pour les virus à isoler, et du virus en lui-même et de son spectre de hôte. La lignée MDBK d'origine bovin était le meilleur choix pour réaliser notre travail du fait que les virus recherchées sont des virus bovins tel que le BoHV-4 qui se multiplie en cultures de cellules bovines primaires (cellules primaires de rein, de testicule, de poumon, de peau, de rate, de thyroïde...) ou dans diverses lignées continues (d'origine rénale (MDBK) et pulmonaire (EBL : pour embryonic bovine lung)) (Bartha et *al.*, 1966; Kit et *al.*, 1986; Luther et *al.*, 1971; Parks & Kendrick, 1973; Rweyemamu & Loreto, 1973; Sass et *al.*, 1974; Smith et *al.*, 1972; Storz et *al.*, 1984; Theodoridis, 1985; Thiry et *al.*, 1981b; Truman, 1985). En effet, selon Bridger (2008) la majorité des études du virus (BVDV) *in vitro*, ont été réalisées sur la lignée cellulaire MDBK (Odeón et al 2009 ; Ahmed et Zaher, 2008). Nombreux auteurs ont utilisé cette lignée pour l'isolement et la cultures de différents virus dans leurs travaux (Khattar et Pandey (1990 ; McCutcheon et al 1995 ; Gonçalves et al 2003 ; Xingnian et Kirkland 2008 ; Zhu et al ,2011 a ; Zhu et al, 2011 b).

Nos résultats ont été obtenus après trois passages sur la lignée MDBK ; ces passages ont été réalisés dans le but d'éliminer toute confusion sur l'apparition d'l'ECP.

lors des manipulations, des contaminations sont survenues dans les cultures cellulaire.

La contamination par les levures de certaines cultures inoculées a montré une lyse ainsi qu'une turbidité du milieu de culture et leur présence a été mise en évidence par observation sous microscope inversé (Cf. Figure 19).

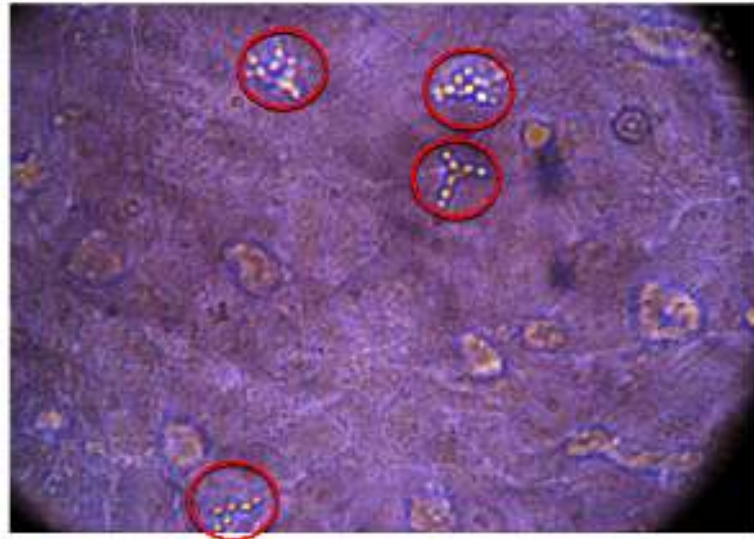


Figure 19 : La contamination par des levures observée sur MDBK sous microscope inverse au GX40
(Photo originale)

La contamination bactérienne a montré une souffrance et lyse des cellules avec un changement du pH du milieu détecté par le virage de la couleur de l'indicateur de pH (rouge phénol) du rouge au jaune, ainsi qu'une turbidité et l'aspect sablé du milieu sous microscope (Cf. figure 20).

Ces contaminations sont survenues malgré l'ajout d'antibiotique et la manipulation sous hotte à flux laminaire.

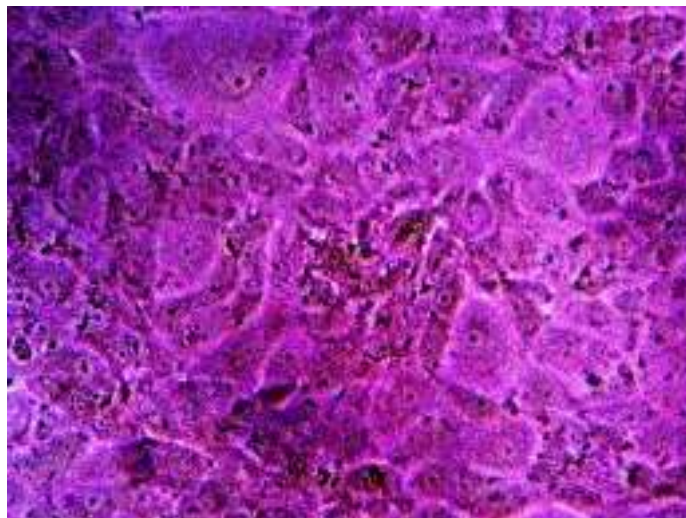


Figure 20 : La contamination bactérienne observée sur MDBK sous microscope inverse au GX40 (Photo originale)

- Selon Thouvenot et *al.*, (2004) Certains ECP d'origine toxique s'observent après inoculation de divers prélèvements; ils peuvent être dus à la présence de toxines bactériennes qui altèrent la nappe cellulaire. Devant un tel ECP, il faut faire un passage de la totalité de la culture, car l'effet toxique ne réapparaît pas, en général, dans la sub-culture.

Pour palier à ces contraintes un deuxième et un troisième passage sont effectués après la filtration de la culture précédente à travers un filtre d'une porosité de 0,22 µm.

-Les résultats de la recherche de l'effet cytopathogène pour la mise en évidence d'agents pathogènes viraux ont montré sur un total de quatorze (14) échantillons (07 culots et 07 surnageant) deux ECP soit un taux de 14,28%. Ces deux ECP se sont manifestés dans les nappes cellulaires inoculées par le surnageant et le culot du prélèvement provenant de la vache 2 au bout du troisième passage après 72h d'incubation.

-Les deux cultures cellulaires inoculées avec le prélèvement 2 (culot et surnageant) ont présentées au 1^{er} passage un début de lyse cellulaire au niveau des extrémités des flacons. Ce phénomène peut être considéré comme un ECP. Au J5 une contamination par les levures est survenue d'où la nécessité d'un 2^{ème} passage et nous avons considéré l'ECP comme peu caractéristique ou complètement absent. Au 2^{ème} passage les mêmes observations à T72 et à J5 et les contaminations étaient d'origine bactérienne. Au 3^{ème} passage à 72h de l'inoculation l'apparition d'un ECP qui s'est prolongé jusqu'à J5 sans contamination de la culture et nous avons considéré notre ECP comme positif. En effet selon Menard, (1997) en l'absence d'ECP 4 à 5 jours après l'inoculation, un second, voir un troisième passage sur cellules sont réalisés afin de faciliter la multiplication des particules virales éventuellement présentes en très petite quantité. Selon (Thouvenot et al, 2004) il est souvent indispensable de procéder à plusieurs passages pour disposer d'un volume suffisant de matériel infectieux pour des tests complémentaires (identification du virus, sensibilité aux antiviraux, stockage de l'isolat)

-L'ECP est caractérisé par l'arrondissement, le détachement des cellules infectées et la fusion des cellules adjacente pour former un syncytium. (Enders, 1954 ; Albrecht et al 1969)

-L'ECP observé sur la nappe inoculée avec le surnagent à 72h est caractérisé par la rétraction et l'arrondissement des cellules et leur décollement sur une partie de la couche cellulaire (Cf. figure 24). Au bout de la 5^{ème} journée on observe l'apparition de foyers constitués par des cellules arrondies, réfringentes, munies de prolongements filamenteux et une lyse presque totale de la nappe cellulaire (Cf. figure 25)

-L'ECP observé sur la nappe inoculée avec le culot à 72h est caractérisé par l'apparition de cellules syncytiales ; cellules géantes avec plusieurs noyaux (Cf. Figure26) a la 5^{ème} journée d'incubation On note la présence de fragments résiduels qui forment des amas plus foncé, la destruction du tapis cellulaire est quasi complète, aucune cellule intacte n'est observé (Cf. Figure 27)

-Les prélèvements provenant des vaches 1, 3, 4, 5, 6 et 7 au bout de 3 passages n'ont représentés aucun ECP, les nappes cellulaire sont restés confluentes, et identiques a celle du témoin négatif apres 72h (Cf. Figure22) et 5 jours (Cf. Figure23). Cela est du a l'absence d'agent pathogènes viraux ou à la présence de virus non cytopathogènes dans ces prélèvements de lait.

-Un effet cytopathogène désigne l'action des particules virales sur les cellules. Certains virus peuvent se multiplier en culture sans produire d'ECP. D'autres n'extériorisent cet ECP qu'après un nombre de jours élevé (8 à 10), ou après un certain nombre de passages en aveugle (Fedida et al ., 1985).

Dans le cas du BHV1, l'ECP se traduit par un arrondissement des cellules qui se regroupent en grappes et laissent autour d'elles des trous dans le tapis cellulaire, du fait de la rétraction du cytoplasme (Menard, 1997).

Dans les travaux de Zhu et al (2011b) les cellules MDBK inoculées avec les échantillons des sécrétions nasales infectées par un adéno virus bovin, ont commencé à s'arrondir et a formé des ponts cytoplasmique après une période d'incubation de cinq jours

Un ECP significatif a également été observé dans la cellule MDBK, infectées par le virus (BVDV) de 24h-48h, dans les travaux de Yugang et al (2011). L'ECP a été caractérisé par des lésions cellulaires évidentes et la formation de lacunes entre les cellules.

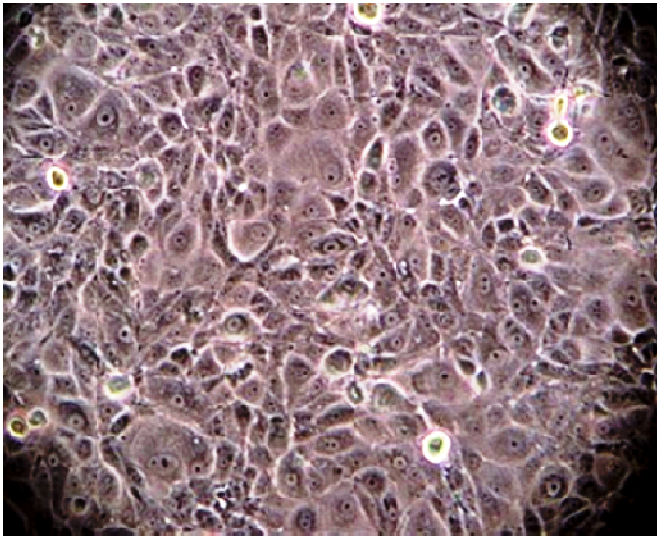


Figure 21 : la nappe cellulaire du Témoin a T0
(photo originale)

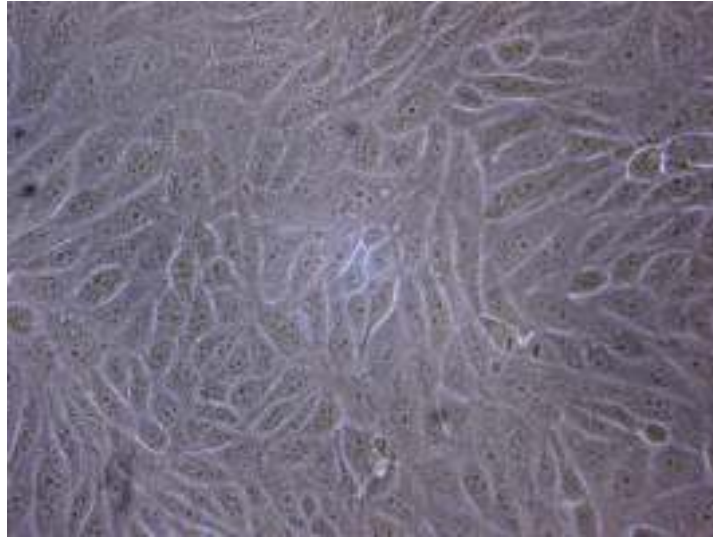


Figure 22 : la nappe cellulaire du Témoin a T= 72h
(photo originale)

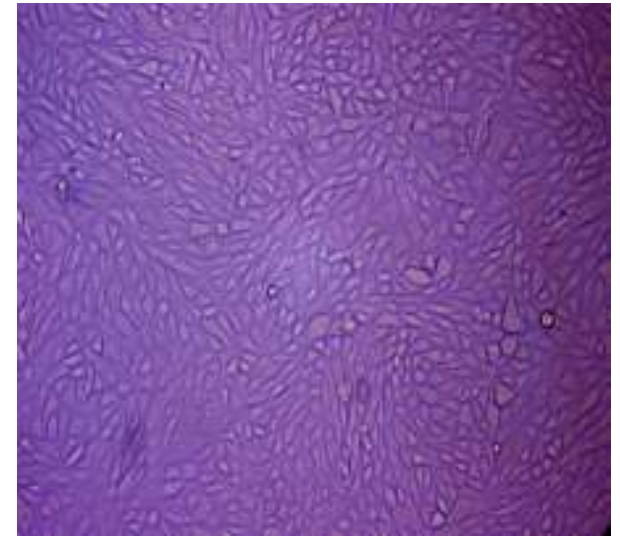


Figure 23 : la nappe cellulaire du Témoin a
T= 5jours (photo originale)

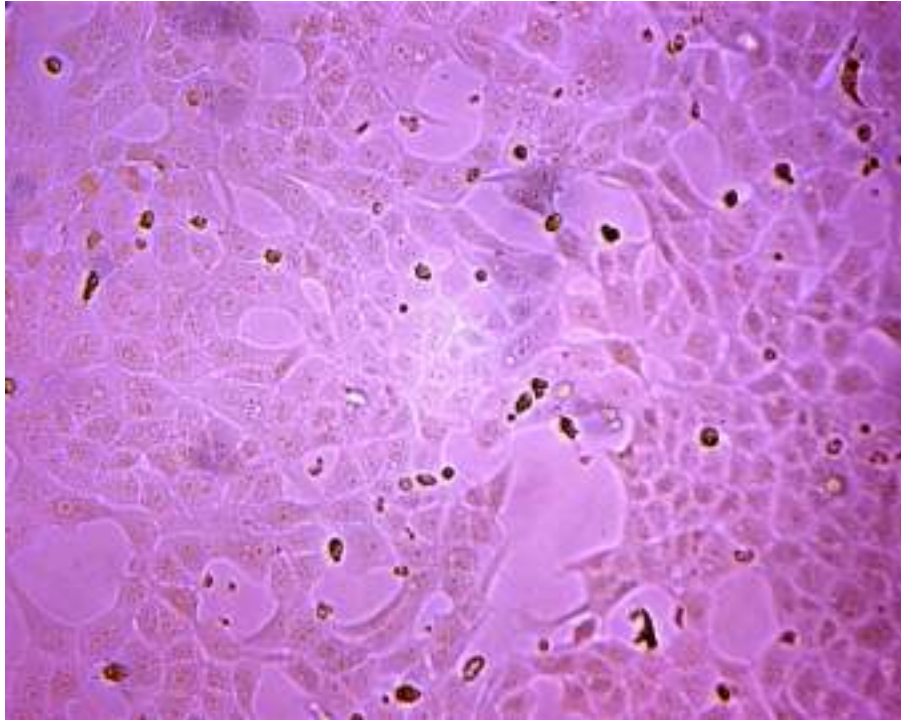


Figure 24 : La nappe cellulaire inoculée avec le surnageant frais du prélèvement 2 après 72h (photo originale)

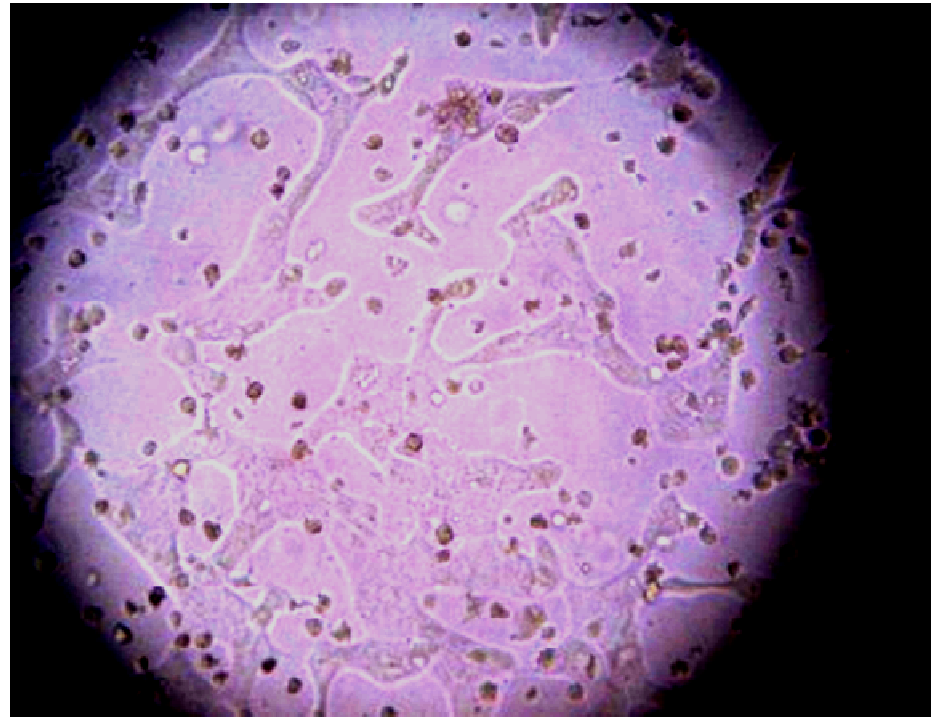


Figure 25 : La nappe cellulaire inoculé avec le surnageant frais du prélèvement 2 après 5 jours (photo originale)

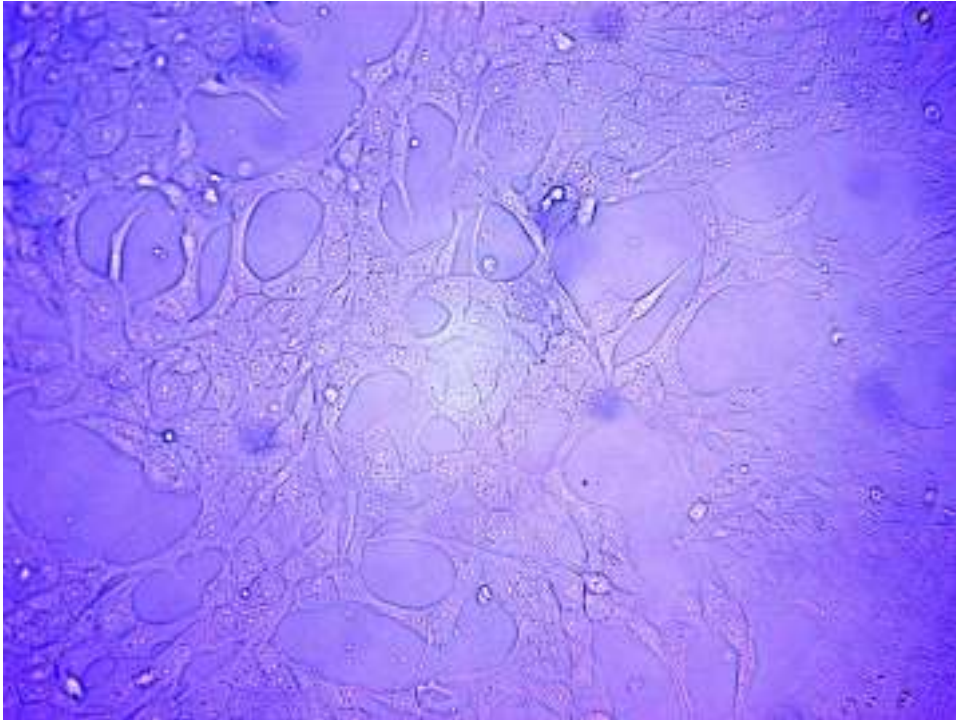


Figure 26 : La nappe cellulaire inoculée avec le culot du prélèvement 2 après 72h (photo originale)

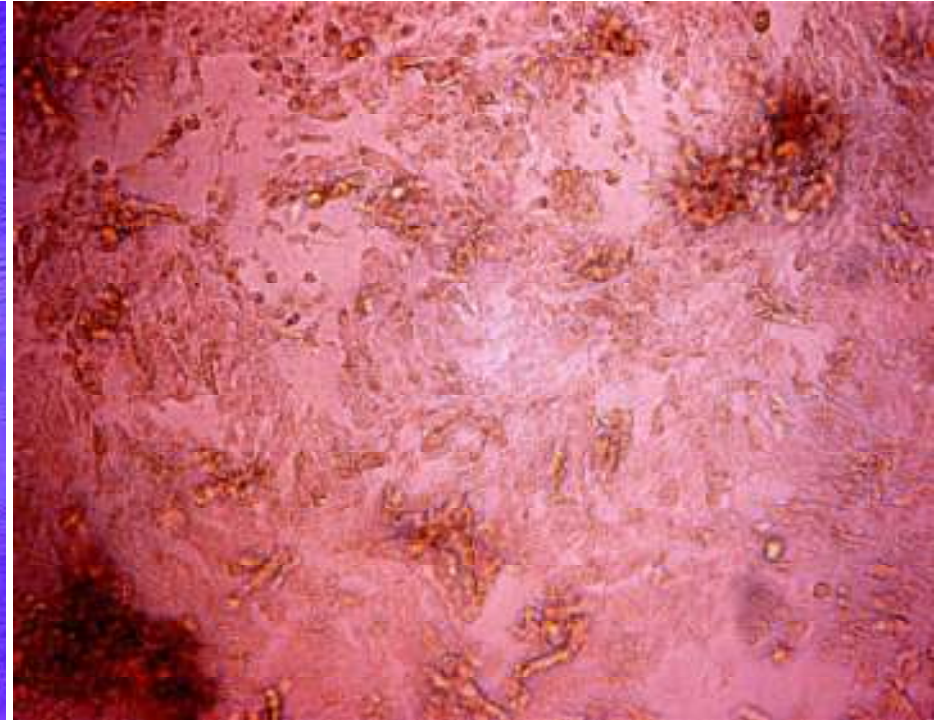


Figure 27 : La nappe cellulaire inoculée avec le culot du prélèvement 2 après 5 jours (photo originale)

CONCLUSION

La mammites se rencontre généralement chez les vaches en lactation, elle entraîne la baisse de la production du lait, d'une part, la baisse des qualités hygiénique et nutritive du lait et de ses produit dérivés, d'autre part (Gombo et al., 2011). D'un point de vue économique cette pathologie représente un des postes de dépense les plus importants pour les éleveurs

Les résultats de notre étude aboutissent à une preuve par diagnostic directe de la présence d'agents pathogènes viraux dans le lait prélevé d'une vache diagnostiquée cliniquement de mammites. Et qui correspond à celle qui a la concentration cellulaire la plus élevée

En effet le diagnostic directe utilisé de notre étude consistait à l'isolement viral sur une culture cellulaire MDBK une lignée cellulaire pour la quelle on a réalisé des essais à fin de mettre à sa disposition toutes les conditions favorable pour mettre en place une lignée apte à l'inoculation (température, atmosphère, milieu de culture, suppléments, pH, environnement aseptique et densité d'ensemencement)

Nous avons remarqué la difficulté d'interpréter l'ECP aux premiers passages en cause des contaminations qui sont survenu dans notre lignée cellulaire mais après élimination de tous cause de contamination, un ECP a été clairement détecté au troisième passage. La différence des ECP obtenus du culot et du surnageant du même prélèvement peut être une preuve de la présence d'au moins deux pathogènes viraux distincts.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **AHMED.W.M. AND KAWTHER S. ZAHER A** , 2008. Field Contribution on the Relation Between Reproductive Disorders and Bovine Viral Diarrhea Virus Infection in Buffalo-Cows Am-Euras. *J. Agric. & Environ. Sci.*, 3 (5): 736-742
- **ALBRECHT THOMAS, MICHAEL FONS, ISTVAN BOLDOGH, AND ALAN S. RABSON.** 1996. Chapter 44 Effects on Cells Medical Microbiology. 4th edition.
- **ARIEL COHEN.**, 2002. Cœur et médecine interne, Volume 1. Ed : De Boeck Secundair, 1393pages
- **AURELIA A HALLER, MILLER T., MITIKU M., & COELINGH, K.** 2000. Expression of the Surface Glycoproteins of Human Parainfluenza Virus Type 3 by Bovine Parainfluenza Virus Type 3, a Novel Attenuated Virus Vaccine Vector. *Journal of Virology*, 74(24), 11626–11635.
- **BARTHAA., JUHASZ M., LIEBERMANN H. .,** 1966. Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. A preliminary report. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* **16**, 357-358.
- **BERTHELOT X., LEBRET P., PETIT C.** (1987) Les infections mammaires de la vache laitière. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 192p.
- **BLACKWELL, J.H. MCKERCHER, P.D., KOSIKOWSKI, F.V., CARMICHAEL, L.E., GOREWIT, R.C.,** 1983. Histological and histochemical characterization of mammary gland tissue of cows infected with foot-and-mouth disease by contact exposure. *Res. Vet. Sci.* **35**, 106-113.
- **BLACKWELL, J.H., YILMA, T.,** 1981. Localization of foot-and-mouth disease viral antigens in mammary gland of infected cows. *Am. J. Vet. Res.* **42**, 770-773.
- **BOUFAIDA. Z. ASNOUNE ,M.J. BUTEL R. OUZROUT** , 2012. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 65 (1-2) : 5-9
- **BURNY A, BRUCK C, CLEUTER Y, COUEZ D, DESCHAMPS J, GHYSDAEL J, GRÉGOIRE D, KETTMANN R, MAMMERICKX M, MARBAIX G.** 1985. Bovine leukemia virus, a versatile agent with various pathogenic effects in various animal species. *Cancer research*. 45(9 Suppl):4578s-4582s
- **BURROWS, R.,** 1968. Excretions of foot-and-mouth disease virus prior to the development of lesions. *Vet. Rec.* **82**, 387-388.

- **BURROWS,R.,MANN, J.A.,GREIG, A.,CHAPMAN,W.G.,GOODRIDGE, D.,** 1971.The growth and persistence of foot-and-mouth disease virus in the bovine mammary gland. *J. Hyg. Camb.* **69**, 307-321.
- **CALLAHAN R, LIEBER MM, TODARO GJ, GRAVES DC, FERRER JF:** 1976. Bovine leukemia virus genes in the DNA of leukemic cattle. *Science* 192: 1005–1007,
- **CEZARD, F. ,** 2013Milieux et matériels de culture cellulaire. In : *Biotechnologies en 27 fiches..* 2 éd. DUNOD, Paris, 5-11.
- **COLLETT, M. S., LARSON, R., GOLD, C., STRICK, D., ANDERSON, D. K. & PURCHIO, A. F.** 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 165, 191-199.
- **DAI FEI ELMER KER, LEE E. WEISS, SILVINA N. JUNKERS, MEI CHEN, ZHAOZHENG YIN, MICHAEL F, SANDBOTHE, SEUNG-IL HUH, SUNGEUN EOM, RYOMA BISE, ELVIRA OSUNA-HIGHLEY, TAKEO KANADE, PHIL G.CAMPBELL.,** 2011. An Engineered Approach to Stem Cell Culture: Automating the Decision Process for Real-Time Adaptive Subculture of Stem Cells. *PLoS ONE* 6(11): e27672. doi: 10.1371/ journal.pone.0027672
- **DENIS F,** 1999. Les virus transmissibles de la mère à l'enfant, Ed : john libby, ISBN
- **DREW,T.W., YAPP, F., PATON,D.J.,** 1999. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milksamples by use of a single-tube RT-PCR. *Vet.Microbiol.* **64**, 145-154.
- **EMANUELSON, U., SCHERLING, K., PETTERSON, H.,** 1992. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev.Vet.Med.* **12**, 121-131.
- **ESPINASSE, J., GILBERT, Y., SAURAT, P.,** 1974. Features of bovine rhinotracheitis in a dairy herd in South-Western France. *Revue deMedecine Veterinaire* **125**, 1441-1452.
- **FEDIDA M, DANNACHER G, PERRIN M, MARTEL JL, MOUSSA A, PERRIN B.,** 1985. Diagnostic de laboratoire des affections respiratoires des bovins (1). *Rec. Méd. Vét,* **161**, 1191-1202.
- **FIROOZI, M.R., AMIGHI, M.,MASTAN, M.B.,MALEKNEZAD, P.,** 1974. In: *Proceedings X Congress Reg.OIEFAO sur les s Epiz. En Asie en Extr. Orient. Et Oceanie, Tehran (Iran),* 20-27

- **FROGER, B. & ADOLPHE, M.**, 1988 Besoins nutritifs des cellules en culture. In : ADOLPHE M.(ed), , Culture de cellules animales Méthodologies –Applications. INSERM, Paris, 9-15.
- **FUCHS,H.-W.**, 1994.Mastitiden:Virusinfectionen. In:Wendt,K., Bostedt,H.,Mielke,H., and Fuchs,H.-W. (Editors), Euter- und Gesäugekrankheiten. Gustav Fisher Verlag Jena (Stuttgart), pp. 422-425.
- **GONÇALVES D.A., SPILKI F.R., CHIMINAZZO C., OLIVEIRA M.A., FRANCO A.C., ROEHE P.M** .2003; Isolamento do vírus Parainfluenza bovino tipo 3 no Rio Grande do Sul, Brasil. Ciencia Rura. 33(5):953–956.
- **GORIAYNOFF -MARKINE, N., MINNER, F., DE FAYS, K., GILLET, L., THIRY, E.,PASTORET, P. P. & VANDERPLASSCHEN, A.** 2003. L’herpe`svirus bovin 4. Ann Med Vet 147, 215–247
- **GOURLAY,R.N., STOTT, E.J.,ESPINASSE, J.,BARLE,C.**, 1974. Isolation of Mycoplasma agalactiae var. bovis and infectious bovine rhinotracheitis virus from an outbreak of mastitis in France. Vet. Rec. **95**, 534-535.
- **GOURREAU, J.M., MOUSSA, A., DUBOIS, A., HERMITTE, P., DELMACHE, P., FEDIDA, M., GUERRIN, R.**, 1989. Epidemic of ulcerative thelitis due tomammillitis herpesvirus inHaute-Marne. PointVeterinaire **21**, 633-635.
- **GOURREAU JM, PAULUZZI L**, 1988. Bovine ulcerative mammillitis. Point Vétérinaire, 20(114):507-520; 143
- **GOVINDA S. VISVESVARA.**; 2002. In Vitro Cultivation of Microsporidia of Clinical Importance. Clinical Microbiology Reviews, 15(3), 401–413..
- **GROOMS D, WALTZ P.**,1997 Epidémiologie et pouvoir pathogène du virus BVD dans les affections respiratoires bovines. In : Comptes rendus du Congrès de la S.F.B. Paris. Toulouse : S.F.B, 119-127.
- **GSTRAUNTHALER, G.**, 2003 Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum : Serum-free Cell Culture. ALTEX, 20(4),275-281.
- **HELAK ARRAY H.** ,2008 cours de virologie, université de SFAX, faculté de médecine, unité de production multimédia
- **HERVE J. A. FLEURY.**, 2009. Virologie humaine, , Ed : Elsevier Masson, 265pages
- **HOGAN J.S., SMITH K.L.**, 2003. Coliform mastitis. Vet. Res.; 34(5):507-19.
- **HOLVECK Thierry** 2002 La FIEVRE APHTEUSE, thèse pour obtention de grade de docteur en Pharmacie UNIVERSITE HENRI POINTCARE – NANCY

- **JACOBS, R.M., POLLARI, F.L.,MCNAB,W.B., JEFFERSON, B.,** 1995. A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. *Can. J. Vet. Res.* **59**, 271-278.
- **JOHN F. ENDERS:** 1954. Cytopathology of virus infections (PARTICULAR REFERENCE TO TISSUE CULTURE STUDIES) *Annu. Rev. Microbiol.* **8**:473-502
- **JOHN RYAN,.** 2004. Corning Incorporated Printed in E.U. KP 5.5M 3/04 TC-306 Français REV 2
- **KAWAKAMI, Y., KAJI, T., KUME, T., OMURO, M., HIRAMUNE, T., MURASE, N., MATUMOTO, M.,** 1966a. Infection of cattle with parainfluenza 3 virus with special reference to udder infection: I.Virus isolation from milk. *Japan J. Microbiol.* **10**, 159-169.
- **KAWAKAMI,Y.,KAJI, T.,OMURO,M.,MARUYAMA,Y.,HIRAMUNE, T.,MURASE,N.,MATUMOTO,M.,** 1966b. Infection of cattle with parainfluenza 3 virus with special reference to udder infection: II.Pathology of the virus to cattle, with particular reference to the mammary gland. *Japan. J. Microbiol.* **10**, 171-182.
- **KHATTAR. S. AND R. PANDEY.,** 1990. Cell culture propagation of calf rotavirus and detection of rotavirus specific antibody in colostrum and milk of cows and buffaloes *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **9** (4), 1131-1138
- **KIT S., KIT M., ICHIMURA H., CRANDELL R., MCCONNELL S.,** 1986. Induction of thymidine kinase activity by viruses with group B DNA genomes : bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 4). *Virus Res*, **4**, 197-212.
- **LANGE E. ,**1995Le recours au laboratoire dans le cadre de la pathologie respiratoire des bovins : exemples du BRSV et du BHV1. Thèse Méd. Vét., Alfort, n°52, 109p.
- **LANSING M. PRESCOTT, LINDA M. SHERWOOD, CHRISTOPHER J. WOOLVERTON.,** 2010. Microbiologie Ed: De Boeck Supérieur, - 1216 pages
- **LETCWORTH,G.J.,LADUE, R.,** 1982.Bovine herpesmammillitis in two New York dairy herds. *JAVMA.* **180**, 902-907.
- **L'HARIDON.R, R. SCHERRER. ,** 1976. Culture in vitro du rotavirus associée aux diarrhées néonatales du veau. *Annales de recherches vétérinaires*, **7** (4), pp.373-381.
- **L'HARIDON R., R. SCHERRER, J.F. VAUTHEROT, C. LA BONNARDIERE, J. LAPORTE, J. COHEN,** 1981 Adaptation d'un isolement de coronavirus entérique bovin à la culture cellulaire et caractérisation de la souche obtenue. *Annales de recherches vétérinaires*, **12** (3), pp.243-251.

- **LUTHER P.D., BRADLEY P.G., HAIG D.A.**, 1971. The isolation and characterization of a herpesvirus from calf kidney cell cultures. *Res. Vet. Sci*, **12**, 496-498.
- **MACLEOD, K. G. & LANGDON, S. P.**, 2004 Essential Techniques of Cancer Cell Culture. In: LANGDON S.P. (ed), *Methods in Molecular Medicine*, vol. 88: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Human Press Inc, Totowa, 17-29.
- **MADIN SH, DARBY NB Jr.** 1958. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1;98(3):574-6.
- **MAMMETTE. A.**, 2002 *Virologie médicale Presses Universitaires Lyon*, - 798 pages
- **MARTIN, W.B., JAMES, Z.H. LAUDER, I.M., MURRAY, M., PIRIE, H.M.**, 1969. Pathogenesis of bovine mammillitis virus infection in cattle. *Am. J. Vet. Rec.* **30**, 2151-2166.
- **MARTIN, W.B., MARTIN, B., HAY, D, LAUDER, I.M.**, 1966. Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. *Vet. Rec.* **78**, 494-497.
- **MCCUTCHEON AR, ROBERTS TE, GIBBONS E, S.M. ELLIS, L.A. BABIUKB, R.E.W. HANCOCKC, G.H.N. TOWERSA.** 1995., Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. ;49(2):101–110
- **MENARD MF. .**, 1997 Les moyens de diagnostic de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) au laboratoire. In : *Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V. Vichy*, 21-22-23 Mai 1997. Paris : S.N.G.T.V, 291-297.
- **MENGESHA ABEBE AGA, BIRHANU HURISA, TIHITINA TESFAYE, HAILU LEMMA, DEREJE NIGUSE, GASHAW G/WOLD, AMHA KEBEDE, TSEHAYNESH MESELE AND KELBESSA URGA.** ; 2014. Adaptation of Local Rabies Virus Isolates to High Growth Titer and Determination of Pathogenicity to Develop Canine Vaccine in Ethiopia. *J Vaccines Vaccin* 5:245. doi: 10.4172/2157-7560.1000245
- **MICHAEL M. HELM, NEIL BOURNE LOVATELLI, A.**, 2006., *Ecloserie de bivalves: manuel pratique*, Ed : Food & Agriculture Org- 184 pages
- **MILOJEVIC, Z., RUSOV, C., ZIVKOVIC, R., STOJICEVIC, S., JOJIC-MALICEVIC, L., BOZOVIC, V.**, 1991. Studies on mastitis, somatic cells and milk chemical composition in cows with enzootic leukosis. *Vet.Glasnik* **45**, 691-696.
- **MOUSSARD. CHRISTIAN**, 2005 *Biologie moléculaire. Biochimie des communications cellulaires* Ed : Boeck Supérieur, 4 oct. 2005 - 328 pages

- **NISKANEN,R.,EMANUELSON,U., SUNDBERG, J., LARSSON,B, ALENIUS,S.,** 1995.Effects of infectionwith bovine virus diarrhoea virus on health and reproductive performance in 213 dairy herds in one county in Sweden.Prev. Vet.Med. **23**, 229-237.
- **ODEÓN. A. C, M. R. LEUNDA, C. FAVERÍN, N. BOYNAK, M. M. VENA, O. ZABAL:** 2009. In vitro amplification of BVDV field strains isolated in Argentina: effect of cell line and culture conditions Revista Argentina de Microbiología 41: 79-85
- **PARKS J.B., KENDRICK J.W.,** 1973. The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. Arch. Gesamte Virusforsch, **41**, 211-215.
- **PASTORET PP , AGUILAR-SETIEN A, SCHOENAERS F ., 978** Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovin Herpesvirus 1). Ann. Méd. Vét,122, 371-391.
- **POTGIETER LND,.** 1977. Current concepts on the role of viruses in respiratory tract disease of cattle. Bov. Pract., , 10, 75-81.
- **POUTREL B.** 1985. Généralités sur les mammites de la vache laitière. Processus infectieux, épidémiologie, diagnostic et méthode de contrôle. Les mammites bovines. Rec. Méd. Vét. 161: 495-512.
- **HERBEIN. G.** Cours DCEM1 Année 2003-2004
- **RADWAN,G.S.,BROCK,K.V.,HOGAN, J.S., SMITH,K.L.,** 1995.Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus.Vet. Microbiol. **44**, 77-92.
- **RAY,D.K., BHATTACHARYYA,U.K., CHOWDHURY,B.,DASGUPTA, P., BHATTACHARYYA,A.K.,** 1989.Studies on a severe outbreak of foot-and mouth disease in regularly vaccinated cross-exotic dairy cattle in West-Bengal (India). Indian J. Anim. Health. **28**, 50-55.
- **ROBERTS, A.W., CARTER,G.R., CARTER, F.A.,** 1974. Infectious bovine rhinotracheitis virus recovered from milk of a cow with mastitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 164,413.
- **RUSOV,C., MILOJEVIC, Z., STOJANOVIC,L.,**1994.Occurrence of mastitis and sanitaryhygienic quality of milk of cows infected with enzootic leukosis.Vet. Glasnik **48**, 303-308.
- **RWEYEMAMU M.M., LORETU K.,** 1973. Isolation of "non-syncytia forming" herpes viruses from cattle in Tanzania. J. Comp. Pathol, **83**, 377-386.
- **SAINI, S.S., SHARMA, J.K.,KWATRA,M.S.,** 1992. Actinomyces pyogenes mastitis lactating cows following foot-and-mouth disease. Vet. Rec. **131**, 152.

- **SASS B., MOHANTY S.B., HETRICK F.M.**, 1974. Fluorescent antibody study of a new bovine herpesvirus (strain DN- 599). *Am. J. Vet. Res.*, **35**, 1343-1346.
- **SCHELCHER F, VALARCHER JF, NAVETAT H, ESPINASSE J.**, 1993. Aspects cliniques de l'infection des bovins par le virus de la maladie des muqueuses (BVDV). *Bull. G.T.V*, **4**, 23-32.
- **SCHEPERS A. J., LAM T.J.G.M., SCHUKKEN Y.H., WILMINK J.B.M., HANEKAMP W.J.A.** 1997 Estimation of variance components for Somatic Cell Counts to determine thresholds for uninfected quarters *J. Dairy Sci.*, **80**, 1833-1840
- **SCOTT, F.M.M., HOLLIMAN, A.**, 1984. Serumantibodies to bovine mamillitis virus in pregnant heifers. *Vet.Rec.* **114**, 19.
- **SEINHORST, J.W., SOL, J., VECHT, U.**, 1991. Effect of damage to the teat end on the experimental induction of mastitis in dry cows with *Corynebacterium pyogenes*. *Vet. Rec.* **128**, 54-56.
- **SIEGLER, H.H., MARSCHANG, F., MORSCHER, H.**, 1984. Beobachtungen über Zusammenhänge zwischen Virusinfektionen und boviner Mastitis. *Tierärztl. Umschau.* **39**, 602-604.
- **SMITH P.C., CUTLIP R.C., RITCHIE A.E., YOUNG J.K. A.**, 1972. bovine herpesvirus associated with a disease of the upper respiratory tract of feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **161**, 1134-1141.
- **SNIDER, T.G., LUTHER, D.G., JENNY, B.F., HOYT, P.G., BATTLES, J.K., ENNIS, W.H., BALADY, J., BLAS-MACHADO, U., LEMARCHAND, T.X., GONDA, M.A.**, 1996. Encephalitis, lymphoid tissue depletion and secondary diseases associated with bovine immunodeficiency virus in a dairy herd. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 117-131.
- **STORZ J., EHLERS B., TODD W.J., LUDWIG H.**, 1984. Bovine cytomegaloviruses : identification and differential properties. *J. Gen. Virol.*, **65**, 697-706.
- **STRAUB, O.C., KIELWEIN, G.**, 1966. Experimentelle Mastitiden durch das Bläschenausschlagvirus des Rindes. *Berl. Münch. Tierärztl. Wöchenschrift* **79**, 310-312.
- **SUN Y, PENG ZL** (2009). Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J*, **85**, 134-40.
- **TRUMAN D**, 1985. Bovines herpesvirus typ 4 (BHV-4) eine studie zur Biologie und Verbreitung. Inaugural-Dissertation Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freie Universität Berlin, Universität Berlin, Berlin, p 285.

- **TADICH N.A., CAREY A., PORTER R.,** et coll. - Case control study of risk factor for toxic mastitis in 26 dairy cows. *Vet. Rec.* 1998; 143:362-365.
- **TARDIF MELANIE,** 2005. Caractérisation du rôle de LFA-1 dans l'infection des lymphocytes T CD4+ par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1. thèse pour obtention de grade de docteur en microbiologie-immunologie. Université Laval.
- **THEODORIDIS A.,** 1985. Studies on bovine herpesviruses. Part 1. Isolation and characterization of viruses isolated from the genital tract of cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **52**, 239-254.
- **THIRY.E.** 2011 Virologie vétérinaire cours de 3e BACVT
- **THIRY E, DOUART A. ,** 2001. Les stratégies vaccinales pour la prévention des pathologies respiratoire du bétail. In : Comptes rendus des Journées Nationales des G.T.V. Clermont-Ferrand, 30-31 Mai – 1er Juin 2001. Paris : S.N.G.T.V, 145-156.
- **THIRY E, LEMAIRE M, SCHYNTS F, MEYER G, DISPAS M, GOGEV S.,** 1999 Les conséquences de l'infection des bovins par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Point Vét,* 30(199), 279-286.
- **THIRY E., PASTORET P.-P., DESSY-DOIZE C., HANZEN C., CALBERG-BACQ C.M.,** 1981. Herpesvirus in infertile bull's testicle. *Vet. rec,* **108**, 426.
- **THOUVENOT D, G BILLAUD, F MORFIN.,** 2004. Actualité de la culture cellulaire et de son application au diagnostic des infections virales. *Virologie.;*8(4):297-309.
- **TURNER, A.J., KOVESDY, L., MORGAN, I.R.,** 1976. Isolation and characterisation of bovine herpesvirus mammillitis virus and its pathogenecity for cattle. *Austr. Vet. J.* **52**, 166-169.
- **VECHT, U., WISSELINK, H.J., HAM-HOFFIES, A.M.,** 1987. Summermastitis. In: Thomas, G., Over, H.J., Vecht, U., and Nansen, P. (Editors) Martinus Nijhoff, Dordrecht, the Netherlands, pp. 90.
- **WELLENBERG, G.J., VAN DER POEL, W.H.M., VAN DER VORST, T.J.K., VAN VALKENGOED, P.H.R., SCHUKKEN, Y.H., WAGENAAR, F., VANOIRSCHOT, J.T.,** 2000. Bovine herpesvirus 4 in bovine clinical mastitis. *Vet. Rec.* **147**, 222-225.
- **WELLENBERG, G.J., VERSTRATEN, E.R.A.M., BELÁK, S., VERSCHUREN, S.B.E., RIJSEWIJK, F.A.M., PESHEV, R., VAN OIRSCHOT, J.T.,** 2001. Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *J. Virol. Meth.* **97**, 101-112.

- **WELLENBERG,G.J.,VERSTRATEN,E.R.A.M., JONGEJAN, F.,VANOIRSCHOT, J.T.,** 2002a. Susceptibility of bovine umbilical cord endothelial cells to bovine herpesviruses and pseudocowpox virus *Vet Res Commun* 26(5):407-17.
- **WELLENBERG G.J., VAN DER POEL W.H., VAN OIRSCHOT J.T.** 2002b Viral infections and bovine mastitis : areview. *Vet. Microbiol.*, , **88**, 27-45.
- **WILLEMS L, BURNY A, COLLETE D, DANGOISSE O, DEQUIEDT F, GATOT JS, KERKHOF P,LEFEBVRE L, MEREZAK C, PEREMANS T, PORTETELLE D, TWIZERE JC, KETTMANN R** (2000) Genetic determinants of bovine leukemia virus pathogenesis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:1787–1795
- **YUGANG GAO, SHIJIE WANG,RUI DU,QUANKAI WANG, CHANGJIANG SUN,NAN WANG, PENGJU ZHANG AND LIANXUE ZHANG.** 2011. Isolation and identification of a bovine viral diarrhea virus from sika deer in china. *Virology Journal*, 8, 83.
- **ZADOKS,R.N., ALLORE,H.G., BARKEMA, H.W., SAMPIMON, O.C., WELLENBERG, G.J. GRÖHN, Y.T., SCHUKKEN, Y.H.,** 2001. Cow and quarter level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* 84(12): 2649-2663
- **ZHU YM, SHI HF, GAO YR, XIN JQ, LIU NH, XIANG WH, REN XG, FENG JK, ZHAO LP, XUE F.** 2011a. Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China. *Vet Microbiol* , **149**(3–4) : 446-451
- **ZHU YUAN-MAO, ZUO YU, HONG CAI, YU-RAN GAO, XIU-MEI DONG, ZHAO-LI LI,HONG-FEI SHI QING-FENG MENG, CHUANG LU, AND FEI XUE ;.**2011b. Isolation, identification, and complete genome sequence of a bovine adenovirus type 3 from cattle in China. *Virology Journal*, 8, 557

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1: Composition du milieu de culture EMEM

Le composant	g/l
Calcium Chloride	0.2
Magnésium Sulfate	0.09767
Potassium Chloride	0.4
Sodium Chloride	5.5
Sodium Phosphate Monobasic	0.122
L- Arginine. HCl	0.126
L-Cystine. 2HCl	0.0313
L-Glutamine	0.292
L-Histidine.HCl ; H ₂ O	0.042
L-Isoleucine	0.052
L-Leucine	0.052
L-Lysine. HCl	0.0725
L-Methiononine	0.015
L-phenylalanine	0.032
L-Threonine	0.048
L-tryptophan	0.01
L-tyrosine 2Na.2H ₂ O	0.0519
L-Valine	0.046
Choline Chloride	0.001
Acide Folique	0.001
Myou-Inositol	0.002
Niacinamide	0.001
D-Pantothenic Acide (hemicalcium)	0.001
Pyridoxal.HCl	0.001
Riboflavin	0.0001
Thyamine.HCl	0.001
Glucose	1.0
HPES	5.958
Phenol Red.NA	0.011

Annexe 2: Composition de la trypsine/EDTA

Les composants	g
Na cl	8.00
K cl	0.40
Na HCO ₃	0.35
Glucose	1.00
Rouge de Phénol	0.001
EDTA	0.20
Trypsine 1/250	0.50

Annexe 3: Petit matériel et équipements de laboratoire

- **Hottes à flux laminaire :**

Elles stérilisent les produits chimiques manipulés par les laborantins. Elles évitent donc la contamination microbienne des échantillons. Ces hottes sont utilisées pour faire des tests de stérilité, des manipulations in-vitro... Il existe deux grandes catégories des hottes à flux laminaire : hotte à flux laminaire horizontale et hotte à flux laminaire verticale. Elles sont équipées d'une lampe UV-C, d'un filtre, d'une régulation automatique, etc. L'éclairage des hottes est assuré par des tubes fluorescents. (Voire figure 2)



Figure 1: Hotte à flux laminaire

- **Incubateur Memmert :**

L'incubateur est idéal pour toutes les applications avec des températures allant jusqu'à +70 ° C, mais en particulier pour l'incubation des cultures vivantes à +37 ° C. (Voire figure 3)



Figure 2: incubateur

- **Bain-marie :**



Figure 3 : Bain-marie

- **Pipetus :**



Figure 4: pipetus

- **Vortex :**



Figure 5 : vortex

- **Cloche d'incubation**



Figure 6 : cloche d'incubation

- Les flacons de 75cm² et 25cm²



Figure 7 : Les flacons de 75cm² et 25cm²

- Les tubes coniques de 10 ml



Figure 8 : Les tubes coniques de 10 ml