

PVRAB

République Algérienne Démocratique Et Populaire



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي العلمي

Université Saad Dahleb Blida 1

جامعة سعد دحلب بليدة 1

Faculté science de la nature et de la vie

Département de Biotechnologie

Laboratoire de Protection et Valorisation des Ressources Agro-Biologique

Mémoire de projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme  
de MASTER II

Filière : Biologie

Option : Biotechnologie Microbienne

Thème :

**Etude du rendement viral de la souche vaccinale RM-65 du  
*Capripoxvirus* sur les cellules BHK-21.**

Présenté par :

- Boudjema Besma
- Cheggour Roufaida Nour el Houda

Soutenu publiquement le : 11/ 07/ 2019 Devant le Jury composé de :

Président	Pr. Krimi Z.	U.S.D. BLIDA1
Promotrice	Pr. Belkahla H.	U.S.D. BLIDA1
Co-promoteur	Dr. Boubguira A.	I.P. ALGER
Examinatrice	Dr. Ammad F.	U.S.D. BLIDA1

Promotion : 2018-2019

## *Remerciements*

En premier lieu, nous tenons à remercier Mr. ISSAD de nous accepter de faire stage au sein de son département de production de produits biologiques vétérinaires de l'IPA, avoir pris le temps de nous orienter à trouver une thématique de travail qui nous convient. Nous désirions exprimer notre profonde gratitude à Monsieur Boubguira Abderrahmane pour avoir accepté de nous encadrer et accueillir au sein du laboratoire de Production et de développement des vaccins viraux vétérinaires, I.P.A., Kouba. Ainsi que Madame Benmessabih Nassira et Monsieur Hamidouche Mohamed pour leurs accompagnements et leurs participations actives, morales et pratiques, tout au long du stage.

Et on tient à exprimer toutes nos reconnaissances à Pr. Belkahla. En tant que directrice de ce mémoire, pour l'aide qu'elle a fournie, sa disponibilité pour nous diriger et pour la qualité des conseils et connaissances qu'elle a sus nous transmettre. Ainsi que nous tenons à exprimer nos remerciements les plus vifs et les plus sincères aux autres membres de jury Pr. Krimi Z. et Dr. Ammad F.

Nous désirions remercier la faculté des SNV, le département de Biotechnologie et le responsable de spécialité Biotechnologie Microbienne, à l'université de Saad Dahleb Blida 1, Professeur Benchaabane, pour tous ces efforts et son soutien durant au cours de notre formation de licence et de master, ainsi que tous les profs qui ont attribué à notre formation.

A Mme Ouahrani de nous avoir guider à accéder aux laboratoires de l'IPA qui conviennent le plus à notre spécialité.

... ainsi que toutes les personnes qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# *Dédicaces*

**Besma.**

Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes chers parents qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que dieux vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

Je dédie aussi ce travail à :

Mon frère ;

À mes tantes, mes oncles, mes cousins et mes cousines ;

Et à tous mes amis et collègue qui m'ont soutenue.

**Roufaida Nour El-Houda**

A ma très chère mère

Source inépuisable de tendresse de patience, et sacrifice, ta prière ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.

Quoique je puisse dire et écrire je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance, j'espère ne jamais te décevoir ni trahir ta confiance et tes sacrifices.

Puisse dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

## دراسة المرذود الفيروسي لسلالة RM-65 للفيروس الجدري على الخلايا BHK-21

### ملخص

جدري الأغنام وجدري الماعز ناجمة عن فيروس من سلالة الكريبوكس (Capripoxvirus). إنها تسبب مرضا سريريا مميزا في سلالات من الأغنام والماعز حساسة للغاية. في الجزائر، تعتمد الوقاية من جدري الأغنام على استخدام لقاح حي مخفف (Clavax®)، التي تنتج من سلالة RM<sub>65</sub> على طريق الخلية الأولية R.M.، والهدف من هذا العمل هو تكييف سلالة اللقاح RM<sub>65</sub> على خلية خالدة جديدة BHK-21 من خلال القراءة المجهرية للتأثير الخلوي (ECP) بعد تلقيح BHK-21 بواسطة Poxvirus متبوعة بدراسة للمعايير الفيروسية للإنوكولات (innocula). تم إجراء بعض ممرات التكيف لدراسة سماحية الخلايا BHK-21 تجاه فيروس Capripoxvirus وتأسيس دراسة المرذود الفيروسي خلال مقاطع. وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها انخفاض تدريجي في العائد الفيروسي خلال ممرات التكيف، وهذا ما يفسره انخفاض حساسية الخلايا تجاه كابريبوكس فيروس. عدم التسامح هذا يرجع إلى العديد من العوامل، لذلك سيكون من الضروري تعميق البحث من خلال العمل على هذه المعايير لتكون قادرة على الحكم على التحقق من صحة / أو عدم هذا الدعم الخلوي.

**الكلمات المفتاحية:** سلالة RM<sub>65</sub>، خلايا RM الأولية، خلايا BHK-21 الخالدة، فيروس جدري الماعز (سلالة الكريبوكس)، التكيف، التأثير الخلوي ECP، المرذود الفيروسي.

## Etude du rendement viral de la souche vaccinale RM-65 du Capripoxvirus sur les cellules BHK-21

### Résumé

La clavelée et la variole caprine sont dues à des souches de *Capripoxvirus*. Elles entraînent une maladie caractéristique du point de vue clinique chez les races d'ovins et de caprins extrêmement sensibles. En Algérie, la prophylaxie de la clavelée est basée sur l'utilisation d'un vaccin vivant atténué (Clavax®), produit à partir de la souche RM<sub>65</sub> sur le support cellulaire primaire R.M. Le présent travail a pour objectif de faire adapter la souche vaccinale RM<sub>65</sub> sur un nouveau support cellulaire immortel BHK-21 par lecture microscopique d'effet cytopathique (ECP) près inoculation des BHK-21 par le *Poxvirus* suivie d'une étude du titre viral des innocula. Quelques passages d'adaptation ont été réalisés afin d'étudier la permissivité des lignées cellulaires BHK-21 vis-à-vis au *Capripoxvirus* et établir la cinétique de rendement viral au cours des passages successifs. Les résultats obtenus ont montré une diminution progressive du rendement viral au cours des passages d'adaptation, cela est donc expliqué par une faible sensibilité des cellules vis-à-vis au *Capripoxvirus*. Cette non permissivité est due à plusieurs paramètres, pour cela il faudrait encore approfondir la recherche en agissant sur ces paramètres pour pouvoir juger la validation/ou non de ce support cellulaire.

**Mots clés :** Souche RM<sub>65</sub>, cellules primaires R.M., cellules immortelles BHK-21, *Capripoxvirus*, adaptation, Effet cytopathique ECP, rendement viral.

## **Study of the viral yield of the Capripoxvirus RM-65 vaccine strain on BHK-21 cells**

### **Abstract**

Sheep pox and goat pox are caused by strains of Capripoxvirus. They cause a clinically characteristic disease in extremely sensitive breeds of sheep and goats. In Algeria, sheep pox prophylaxis is based on the use of a live attenuated vaccine (Clavax ®), produced from the RM65 strain on the RM primary cell support. The aim of this work is to adapt the vaccine strain RM65 on a new immortal cell support BHK-21 by microscopic reading of cytopathic effect (ECP) after inoculation of BHK-21 by Poxvirus followed by a study of the viral titre of inocula. Some adaptation passages were made to study the permissiveness of BHK-21 cell lines vis-à-vis Capripoxvirus and establish the kinetics of viral yield during successive passages. The results obtained showed a gradual decrease in the viral yield during the adaptation passages, this is explained by a low sensitivity of the cells vis-à-vis Capripoxvirus. This non-permissiveness is due to several parameters, for this it would be necessary to deepen the research by acting on these parameters to be able to judge the validation / or not of this cellular support.

**Key words:** RM65 strain, MRM primary cells, BHK-21 immortal cells, Capripoxvirus, adaptation, cytopathic effect ECP, viral yield

# Liste des abréviations

---

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	<b>Acide Désoxyribonucléique</b>
<b>ARN</b>	<b>Acide ribonucléique</b>
<b>ARNm</b>	<b>Acide ribonucléique messenger</b>
<b>ATTC</b>	<b>American Type Culture Collection</b>
<b>BCG</b>	<b>Vaccin Bilié de Calmette et Guérin</b>
<b>BHK-21</b>	<b>Baby Hamster kidneys Cells</b>
<b>BSR</b>	<b>Bébé hamster Renal</b>
<b>CAPV</b>	<b>Capripoxvirus</b>
<b>CEV</b>	<b>Virions Enveloppés associés à la Cellule</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>Dioxyde de carbone</b>
<b>D.T</b>	<b>Dilution terminale</b>
<b>DICT<sub>50</sub></b>	<b>Dose Infectieuse de 50% de la Culture de Tapis</b>
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b>
<b>DMSO</b>	<b>Diméthylsulfoxyde</b>
<b>DSV</b>	<b>Direction des Services Vétérinaires</b>
<b>ECP</b>	<b>Effet Cytopathogène</b>
<b>EDTA</b>	<b>Éthylènediaminetétraacétique</b>
<b>EEV</b>	<b>Virions ectracellulaires enveloppés</b>
<b>EMEM</b>	<b>Eagle's minimal essential medium</b>
<b>FAO</b>	<b>Food and Agriculture Organization of the United Nations</b>
<b>GTPV</b>	<b>Goatpox virus</b>
<b>IEV</b>	<b>Virions intracellulaires enveloppés</b>
<b>IMV</b>	<b>Virions intracellulaires matures</b>
<b>IPA</b>	<b>Institut Pasteur d'Algérie</b>

## Liste des abréviations

---

<b>ITR</b>	<b>Répétitions terminales inversées</b>
<b>Kb</b>	<b>Kilobase</b>
<b>Kpb</b>	<b>Kilo paire de base</b>
<b> LSDV</b>	<b>Lumpy skin disease virus</b>
<b> MDBK</b>	<b>Madin-Darby Bovine kidney</b>
<b> MDCK</b>	<b>Madin-Darby Canine Kidney cells</b>
<b>Orf</b>	<b>Open reading frame</b>
<b>Pb</b>	<b>Paire de base</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase Chain Reaction</b>
<b>pH</b>	<b>Potentiel Hydrogène</b>
<b>PPR</b>	<b>Peste des Petits Ruminants</b>
<b>PSM</b>	<b>Poste de Sécurité Microbiologique</b>
<b>RIMC</b>	<b>Réponse Immunitaire à Médiation Cellulaire</b>
<b>RIMH</b>	<b>Réponse Immunitaire à Médiation humorale</b>
<b>R.M.</b>	<b>Cellules Rein de Mouton</b>
<b>SPPV</b>	<b>Sheeppox virus</b>
<b>SVF</b>	<b>Sérum de Veau Fœtal</b>
<b>T<sub>25</sub></b>	<b>Taille de 25cm<sup>2</sup></b>
<b>VEE</b>	<b>Virus Extracellulaire Enveloppé</b>
<b>VERO</b>	<b>Verda Reno (Rein vert)</b>
<b>VIE</b>	<b>Virus Intracellulaire Enveloppé</b>
<b>VIM</b>	<b>Virus Intracellulaire Mature</b>

# Liste des figures

---

## Liste des figures

### Etude bibliographique

- Figure 1** : Schéma d'un virion IMV et EEV d'un *Poxvirus*.....7
- Figure 2** : Carte linéaire issue d'une PCR du génome du *Capripoxvirus*.....9
- Figure 3** : Image du vecteur de la famille des Muscidae : *Stomoxys calcitrans* et *Musca domestica* .....10
- Figure 4** : Image d'un Proboscis de type piqueur de *S.calcitrans* (A) et de type lécheur de *M.domestica* (B).....11
- Figure 5** : Cycle de répllication viral d'un *Poxvirus*.....12
- Figure 6** : Répartition mondiale de la clavelée et variole caprine (zone grise).....14
- Figure 7** : Symptôme de variole caprine chez la chèvre.....15
- Figure 8** : Symptômes de la clavelée chez le mouton.....16
- Figure 9** : Courbe de croissance d'une ligné cellulaire.....28

### Etude expérimentale

- Figure 10** : Cryotube contenant les cellules BHK-21..... 32
- Figure 11** : Cuve en inox liée au support de filtration.....34
- Figure 12** : Schéma récapitulatif sur la répartition du milieu DMEM et la Trypsine-verséne et antibiotique- antimycosique suivie d'un test de contrôle de stérilité.....35
- Figure 13** : Conditionnement du matériel pour passer à la stérilisation à l'autoclave.....36
- Figure 14** : Processus de décongélation des cellules BHK-21.....37
- Figure 15** : Observation au microscope photonique inversé des cellules BHK-21 (Gr x 40) suite au renouvellement du milieu après 4h de mise en culture des cellules.....38
- Figure 16** : Schéma de procédé de la trypsination sur les cellules BHK-21.....39
- Figure 17** : Observation au microscope photonique inversé des cellules BHK-21 (Gr x 40) après trypsination..... 40

## Liste des figures

---

<b>Figure 18</b> : Schéma explicatif du procédé de l'infection sur les cellules BHK-21.....	41
<b>Figure 19</b> : Methode de Numération à la cellule de Malassez.....	42
<b>Figure 20</b> : Lecture d'apparition d'effet cytopathogène (ECP) du <i>Poxvirus</i> sur des boites de cellules BHK-21 inoculées au microscope optique inversé (Gr x 40).....	43
<b>Figure 21</b> : Exemple d'une lecture de microplaque de titrage à 7js.....	44
<b>Résultats et discussion générale</b>	
<b>Figure 22</b> : Lecture au microscope photonique inversé Gx10 des puits d'une microplaque de titrage à J7.....	48
<b>Figure 23</b> : Cinétique du rendement viral au cours des passages d'adaptation.....	49

# Liste des tableaux

---

## Liste des tableaux

### Etude bibliographique

<b>Tableau 1</b> : Taxonomie du <i>Poxvirus</i> .....	4
<b>Tableau 2</b> : Les différentes souches de virus claveleux isolées dans le monde.....	16
<b>Tableau 3</b> : Souches de virus claveleux isolées en Algérie.....	17
<b>Tableau 4</b> : Synthèse de la situation sanitaire de la clavelée en Algérie de 2004 jusqu'au 2013).	18
<b>Tableau 5</b> : Dates et développements des différents vaccins.....	19
<b>Tableau 6</b> : Caractéristiques des cellules BHK-21.....	26

### Etude expérimentale

<b>Tableau 7</b> : Résultats de titrage des suspensions virales récoltées au cours des passages d'adaptation.....	48
---	----

# Table des matières

---

## Introduction

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

### Partie 1 : Etude du virus (agent causal) : *Capripoxvirus*

1- Taxonomie.....	4
2- Morphologie et structure.....	7
3- Propriétés moléculaire.....	8
4- Propriétés immunologiques (antigénique).....	9
5- Propriétés physicochimiques .....	9
6- Voies de transmission.....	10
7- Cycle de réplication virale.....	11

### Partie 2 : Etude du pouvoir pathogène (La clavelée)

1- Définition de la clavelée.....	13
2- Impact économique.....	13
3- Répartition géographique.....	13
4- Symptômes.....	14
5- Différentes souches du virus dans le monde.....	16
6- Situation zoo sanitaire en Algérie.....	18

### Partie 3 : Production de vaccin

1- Historique de la vaccination.....	19
2- Principes de la vaccination.....	20
3- Types de vaccins.....	20
3-1- Vaccins atténués .....	20
A- Vaccins vivants atténués.....	20
B- Vaccins vectorisés.....	21
C- Vaccins à ADN.....	21
3-2- Vaccins inertes.....	21
A- Vaccin inactivé.....	21
B- Vaccins sous unitaires.....	22
3-3- Fractions antigéniques.....	22
4- Types de production.....	22

## Table des matières

4-1- Production par ovoculture.....	22
4-2- Production en biogénérateur.....	22
4-3- Production en monocouche.....	22
<b>5- Culture cellulaire.....</b>	<b>23</b>
5-1- Principe et historique.....	23
5-2- Types de culture cellulaire.....	23
A- Système de culture stationnaire ou en monocouche.....	24
B- Système de culture en suspension.....	24
5-3- Types de lignée cellulaire.....	24
5-3-1- Lignées cellulaires primaires.....	25
5-3-1-1- Exemple de lignées cellulaires primaires : cellules de rein de mouton (RM).25	
5-3-1-2- Lignées cellulaires immortelles.....	25
5-3-1-2-1- Exemple de cellule immortelle : cellules de rein d'Hamster (BHK-21).....	26
A- Origine et historique.....	26
B- Caractéristiques.....	26
5-4- Etablissement des lignées cellulaires.....	27
5-4-1- Repiquage.....	28
5-4-2- Isolement viral sur culture cellulaire.....	29
5-4-3- Permissivité des cellules vers les virus.....	39
5-4-4- Effet cytopathogène ECP.....	30

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

### Matériels et méthodes

<b>1- Matériels.....</b>	<b>32</b>
<b>1-1- Matériel biologique.....</b>	<b>32</b>
1-1-1- Lignées cellulaires.....	32
A- Cellules R.M.....	32
B- Cellules BHK-21.....	32
1-1-2- Souche Virale RM <sub>65</sub> .....	32
<b>1-2- Milieux et réactifs.....</b>	<b>33</b>
1-2-1- Stérilisation et répartition des produits de culture cellulaire.....	34
1-2-2- Contrôle de stérilité des produits de culture cellulaire.....	35
<b>2- Méthodes.....</b>	<b>36</b>
<b>2-1- Conditionnement et stérilisation du matériel.....</b>	<b>36</b>
2-1-1- Conditionnement du matériel.....	36

# Tables des matières

---

2-1-2- Stérilisation du matériel à l'autoclave.....	36
<b>2-2- Décongélation et mise en culture des cellules BHK-21.....</b>	<b>37</b>
2-2-1- Décongélation.....	37
2-2-2- Mise en culture.....	38
<b>2-3- Passage d'entretien des cultures cellulaires (Trypsination).....</b>	<b>38</b>
2-3-1- Surveillance des cultures après l'entretien.....	40
A- Variation du PH.....	40
B- Observation sous microscope photonique inversé.....	40
C- Etude morphologique.....	40
<b>2-4- Passages d'infection virale (Inoculation).....</b>	<b>40</b>
2-4-1- Surveillance et observation de l'effet cytopathique.....	42
2-4-2- Récolte des suspensions virales.....	42
2-4-3- Titrage du virus.....	42
2-4-4- Lecture finale du titrage.....	43
2-4-4-1- Exemple de calcul du titre viral.....	43

## Chapitre 3 : Résultats et discussion générale

<b>1- Résultats.....</b>	<b>46</b>
1-1- Inoculation des BHK-21 par le <i>Poxvirus</i> .....	46
1-2- Etude de la cinétique du titre viral au cours des passages successifs d'adaptation.....	47
1-2-1- Titrage de la suspension virale récoltée.....	47
<b>2- Discussion générale.....</b>	<b>49</b>

## Conclusion et perspectives

## Références bibliographiques

## Annexes

# **Introduction**

# Introduction

---

La clavelée ou variole ovine est une maladie infectieuse causée par un virus appartenant à la famille des *Poxvirus* et au genre des *Capripoxvirus* (**Kitching, 1983**). Cette affection sévit sous forme enzootique dans la plupart des pays d'Afrique, au Moyen-Orient et dans une grande partie de l'Asie. Elle représente, pour ces pays, un véritable fléau économique en raison des forts taux de mortalité, surtout enregistrés chez les jeunes animaux, Il n'y a pas lieu de s'en étonner puisque, malgré tous les progrès réalisés dans le domaine de la science médicale vétérinaire et la facilité de la mise en vigueur des divers procédés de prophylaxie à l'égard de l'homme (**Achour et al., 2000**).

Pour les pays affectés, la lutte contre la clavelée repose essentiellement sur la prophylaxie médicale, la vaccination demeurant le seul moyen connu et efficace capable de conduire à l'éradication, ou tout au moins d'atténuer les conséquences néfastes de la maladie (**Bhanuprakash et al., 2011**).

En Algérie, la prophylaxie de la clavelée fait appel à l'utilisation d'un vaccin de type sensibilisé. Celui-ci est produit sur mouton à l'aide d'une souche d'origine marocaine dénommée Casablanca (**Achour et al., 2000**). Actuellement un vaccin vivant atténué Clavax ® est produit *In-Vitro* sur des cellules de lignées primaires de mouton, par l'utilisation d'une souche vaccinale provenant de Yougoslavie nommée « RM<sub>65</sub> » (**Anonyme, 2013**).

Les bioprocédés ont connu un essor considérable dans les industries pharmaceutiques au cours de ces dernières décennies ; les biotechnologies y ont réussi leur pari en passant, en l'espace de quelques années, de la théorie à la réalité. À constater l'évolution forte du marché des biomédicaments, les biotechnologies et l'industrie pharmaceutique sont de plus en plus intimement lié. Cela se concrétise particulièrement bien en ce qui concerne le domaine des vaccins, puisque la production de vaccins est complètement indissociable des techniques de culture de cellules animales (**Duigou, 2005**).

L'utilisation de procédés de cultures de cellules animales pour la production de nombreuses molécules à visée thérapeutique, telles que les vaccins viraux, est en large expansion depuis le milieu du siècle dernier. Plus spécifiquement, dans le cas de la production de vaccins, le procédé de production viraux basé sur la culture des cellules de lignées (**Kretzmer et Klein, 2002**).

Chaque année, l'Institut Pasteur d'Algérie (I.P.A) produit en moyenne 20 millions de doses de ce vaccin (par la souche vaccinale actuelle RM<sub>65</sub>), en fonction des besoins exprimés par la direction des services vétérinaires (D.S.V), pour assurer les campagnes nationales de prophylaxie (**Anonyme, 2013**).

## Introduction

---

Pour des raisons de coût, de difficulté d'obtention des fœtus et de la souche ainsi que de difficulté de maintien en culture (nombre de passage limité) il apparaît aujourd'hui nécessaire de rechercher un autre vaccin, produit sur culture cellulaire par un autre type de support cellulaire choisis (**Costa et al., 2005**).

Ce travail a pour but d'adapter la souche vaccinale RM<sub>65</sub> sur un nouveau support cellulaire pour la production de vaccin anti-caveleux par la lignée immortelle BHK-21, en effectuant des inoculations successives avec la souche virale RM<sub>65</sub> sur les cellules BHK-21 afin d'étudier le rendement viral par l'étude de l'apparition d'effet cytopathique (ECP), la récolte et le titrage des suspensions virales obtenues. Cette étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de production et de développement des vaccins viraux vétérinaires de l'I.P.A, Annexe Kouba.

# **Chapitre 1 :**

## **Etude bibliographique**

# Etude bibliographique

## Partie 1 : Etude de virus (agent causal) : *Capripoxvirus*

### 1-Taxonomie

La famille des *Poxviridae* se divise en deux sous-familles dont les membres infectent soit les vertébrés pour la sous-famille des *Chordopoxvirinae* soit les invertébrés pour les *Entomopoxvirinae* (Knipe et al., 2011 ; Anonyme, 2015).

Selon le Comité international de taxonomie des virus (ICTV) (Tableau1), le *Capripoxvirus* appariaient à la sous famille des *Chrodopoxvirinae*. Le genre *Capripoxvirus* contenant trois espèces : Virus de la variole caprine (*GTPV*), Virus de la variole ovine (*SPPV*), Virus de la maladie de la peau en plaques (*LSDV*) (Skinner et al., 2019).

**Tableau 1 : Taxonomie du *Poxvirus* (Skinner et al., 2019).**

<b>Famille</b>	<b>Sous-famille</b>	<b>Genre</b>	<b>Espec</b>
<i>Poxviridae</i>	<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Avipoxvirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Canarypox virus</i></li> <li>- <i>Fowlpox virus</i></li> <li>- <i>Juncopox virus</i></li> <li>- <i>Mynahpox virus</i></li> <li>- <i>Pigeonpox virus</i></li> <li>- <i>Psittacinepox virus</i></li> <li>- <i>Quailpox virus</i></li> <li>- <i>Sparrowpox virus</i></li> <li>- <i>Starlingpox virus</i></li> <li>- <i>Turkeypox virus</i></li> </ul>
		<i>Capripoxvirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Goatpox virus</i></li> <li>- <i>Lumpy skin disease virus</i></li> <li>- <i>Sheeppox virus</i></li> </ul>
		<i>Centapoxvirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Yokapox virus</i></li> </ul>
		<i>Cervidpoxvirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Mule deerpox virus</i></li> </ul>
		<i>Crocodylidpoxvirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Nile crocodilepox virus</i></li> </ul>
		<i>Leporipoxvirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Hare fibroma virus</i></li> <li>- <i>Myxoma virus</i></li> <li>- <i>Rabbit fibroma virus</i></li> <li>- <i>Squirrel fibroma virus</i></li> </ul>

## Etude bibliographique

		<i>Molluscipoxvirus</i>	- <i>Molluscum contagiosum virus</i>
		<i>Orthopoxvirus</i>	- <i>Camelpox virus</i> - <i>Cowpox virus</i> - <i>Ectromelia virus</i> - <i>Monkeypox virus</i> - <i>Raccoonpox virus</i> - <i>Skunkpox virus</i> - <i>Taterapox virus</i> - <i>Vaccinia virus</i> - <i>Variola virus</i> - <i>Volepox virus</i>
		<i>Parapoxvirus</i>	- <i>Bovine papular stomatitis virus</i> - <i>Orf virus</i> - <i>Parapoxvirus of red deer in New Zealand</i> - <i>Pseudocowpox virus</i>
		<i>Suipoxvirus</i>	- <i>Swinepox virus</i>
		<i>Yatapoxvirus</i>	- <i>Tanapox virus</i> - <i>Yaba monkey tumor virus</i> - <i>Pteropox virus</i> - <i>Squirrelepox virus</i>
	<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	- <i>Anomala cuprea entomopoxvirus</i> - <i>Aphodius tasmaniae entomopoxvirus</i> - <i>Demodema bonariensis entomopoxvirus</i> - <i>Dermolepida albohirtum entomopoxvirus</i> - <i>Figulus sublaevis entomopoxvirus</i> - <i>Geotrupes sylvaticus entomopoxvirus</i> - <i>Melolontha melolontha entomopoxvirus</i>

## Etude bibliographique

		<p><i>Betaentomopoxvirus</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Acrobasis zelleri entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Adoxophyes honmai entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Arphia conspersa entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Choristoneura biennis entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Choristoneura conflictata entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Choristoneura diversuma entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Choristoneura fumiferana entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Choristoneura rosaceana entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Chorizagrotis auxiliaris entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Heliothis armigera entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Locusta migratoria entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Mythimna separata entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Oedaleus senegalensis entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Operophtera brumata entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Schistocerca gregaria entomopoxvirus</i></li> </ul>
		<p><i>Gammaentomopoxvirus</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Aedes aegypti entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Camptochironomus tentans entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Chironomus attenuatus entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Chironomus luridus entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Chironomus plumosus entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Goeldichironomus holoprasinus entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Diachasmimorpha entomopoxvirus</i></li> <li>- <i>Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus</i></li> </ul>



## 2-Morphologie et structure

Les *Poxvirus* font partie des plus gros virus animaux connus. Les virions sont de forme ovoïde parallélipédique ovale (Fig.1) (Murphy et al., 1999). Le virus de la clavelée est un virus de forme ovoïde, enveloppé mesurent 270 x 300 x 200 nm (Haller et al., 2013).

Le virion est constitué du core et d'un nombre variable de membranes et d'enveloppes (Vilagines, 1985). Des structures supplémentaires situées dans les concavités du core ont aussi été décrites et sont appelées les « corps latéraux » (Vilagines et al., 1985 ; Moss, 1992).

La réplication du virus de la clavelée est exclusivement cytoplasmique (Prescott-lansing et al., 2013), où durant le cycle de réplication la nature et le nombre d'enveloppes permettent de distinguer trois formes distinctes de virions : les IMV (virions intracellulaires matures), les IEV (virions intracellulaires enveloppés) et les EEV (virions extracellulaires enveloppés) ou CEV (virions enveloppés associés à la cellule). Les IMV sont formés dans le cytoplasme. On leur attribue classiquement une seule membrane ce qui a été confirmé par des observations en microscopie électronique. Les IMV représentent la très grande majorité du progénie viral et sont libérés lors de la lyse de la cellule hôte (Fig.1) (Moss, 2001). Cette forme est la plus résistante et serait adaptée au passage du virus d'un hôte à l'autre (Moss, 2001).

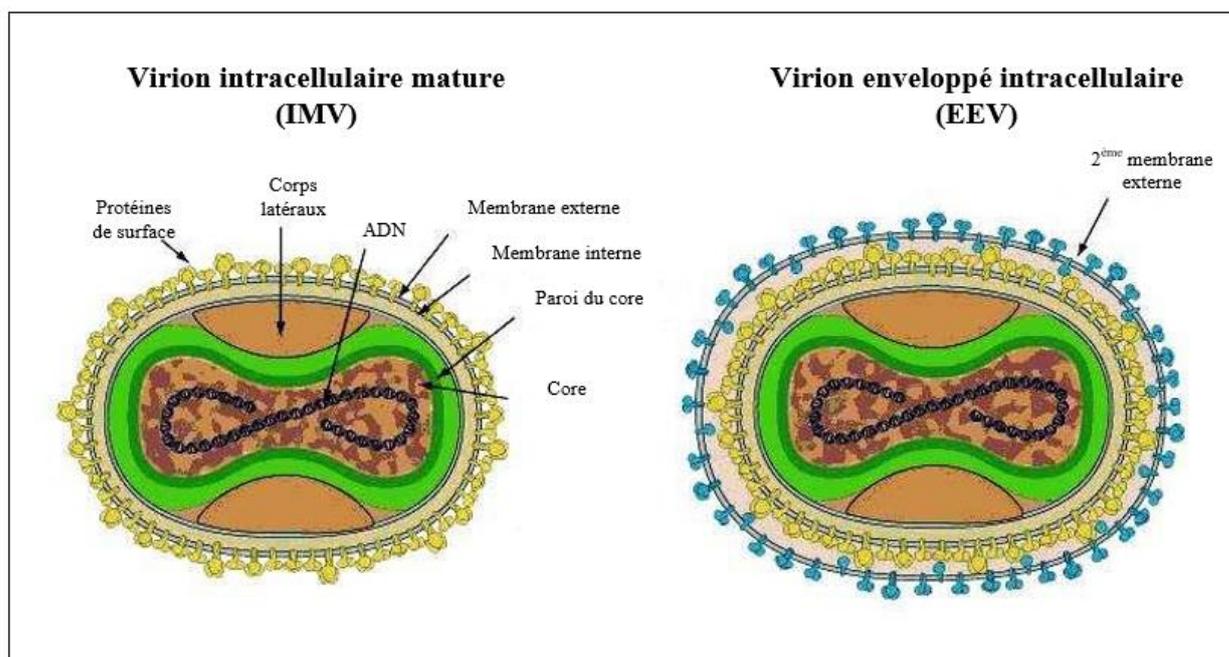


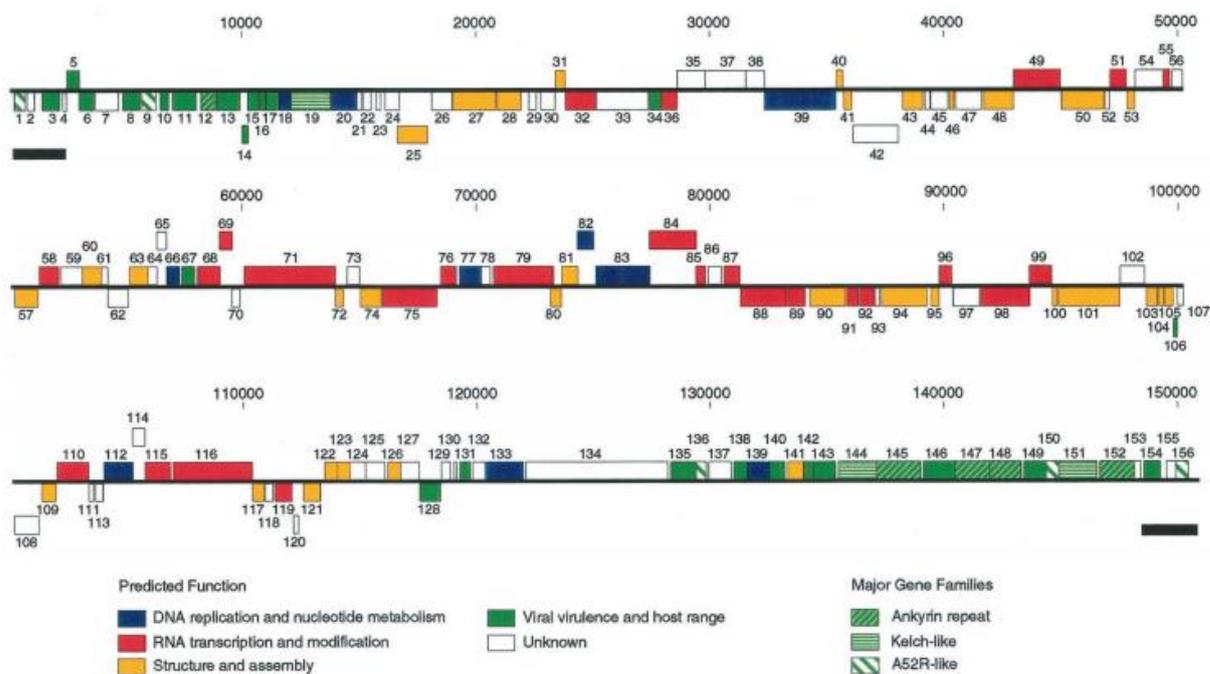
Figure 1 : Schéma d'un virion IMV et EEV d'un *Poxvirus* (<http://www.isb-sib.ch>, 2009)

### 3-Propriétés moléculaire

L'ADN génomique à double brin porte un seul segment linéaire (Monopartite) (**Anonyme, 2004**), a une taille d'environ 154 kpb avec une région centrale moins variable délimitée par deux répétitions terminales inversées (ITR) identiques aux extrémités (**Tulam et al., 2001 ; Kara et al., 2003**). Les *Capripoxvirus* ont la plus forte teneur en A-T, à savoir 73-75%. Le génome viral partage 147 gènes supposés qui codent pour des protéines de 53 à 2227 acides aminés susceptibles de jouer un rôle dans la réplication, la structure, la virulence et les fonctions de la gamme d'hôtes. Les gènes de *SPPV*, *GTPV* et *LSDV* présentent 96% d'identité de nucléotide et d'acides aminés sur toute leur longueur (**Tulman et al., 2002 ; Zeng et al., 2014**) et 9 gènes de *LSDV* avec une virulence probable et les fonctions de la gamme d'hôtes sont perturbées dans *SPPV* et *GTPV*. Le *SPPV* et le *GTPV* sont probablement dérivés du *LSDV*, mais ils possèdent des différences de nucléotides spécifiques (**Moss et Shisler, 2001**), le génome du *LSDV* contient une région de codage central liée à deux régions de répétition terminale inversée (ITR) identiques contenant au moins 2 418 pb aux deux extrémités (Fig. 2). Les 241 nucléotides les plus terminaux de la séquence assemblée contiennent 7,5 copies d'une répétition en tandem imparfait de 24 pb et quatre copies d'une répétition en tandem imparfait de 15 pb et sont similaires à celles décrites dans *SPPV* (**Gershon et al., 1989**).

La région codante du génome du *CaPV* comprend 1-156 ORF dans lesquels les ORFs centraux (024-123) sont des gènes conservés impliqués dans les mécanismes de réplication et de transcription, tandis que les ORFs terminaux (001-023 et 124-156) sont de nature variable et impliquent chez l'hôte. (**Moss et Shesler, 2001**).

# Etude bibliographique



**Figure 2 :** Carte linéaire issue d'une PCR du génome du *Capripoxvirus* (Tulman et al., 2001).

Exemple (*LSDV*) (Les ORF sont numérotés de gauche à droite en fonction de la position du codon d'initiation de la méthionine. Les ORF transcrits à droite sont situés au-dessus de la ligne horizontale ; Les ORF transcrits à gauche sont ci-dessous. Les gènes ayant des fonctions similaires et les membres de familles de gènes sont colorés en fonction de la clé de figure. Les ITR sont représentés par des barres noires sous la carte ORF).

## 4-Propriétés immunologiques (antigénique)

Dans chaque genre de la sous-famille *Chordopoxvirinae*, il existe une protection et une réactivité croisées sérologiques considérables. Les anticorps neutralisants sont spécifiques au genre (Anonyme, 2004 ; Skinner et al., 2019).

## 5-Propriétés physicochimiques

La résistance du *SPPV* et du *GTPV* à l'action physique et chimique est décrite ci-dessous (Anonyme, 2012 ; Skinner et al., 2019) :

- Température : en général, *SPPV* et *GTPV* sont inactivés à 56°C / 2 h ; 65°C / 30 min. Ils sont sensibles à la lumière du soleil.
- Le potentiel hydrogène (pH) : les virus *SPPV* et *GTPV* survivent entre 6,6 et 8,6. Ils sont sensibles aux pH fortement alcalins ou acides (acide chlorhydrique ou sulfurique à 2% / 15 min).
- Désinfectants de type produits chimiques : les virus sont inactivés par le phénol (2%) en 15 minutes. Ils sont sensibles aux détergents (ex. Dodécyl sulfate de sodium) et à l'éther (20%), au

## Etude bibliographique

---

chloroforme, au formol (1%), à l'hypochlorite de sodium (2-3%), aux composés de l'iode (dilution au 1/33), Virkon (2%), composés d'ammonium quaternaire (0,5%).

-Survie : le *SPPV* et *GTPV* restent viables pendant au moins 3 mois dans la laine, poils et les croûtes sèches de la peau. Ils survivent à plusieurs cycles de gel-dégel, mais leur pouvoir infectieux peut être réduit.

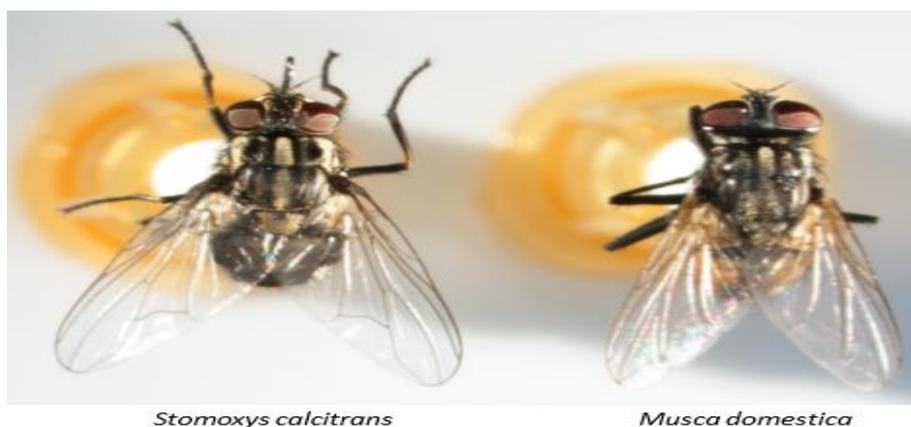
### 6-Voies de transmissions

#### - Transmission directe

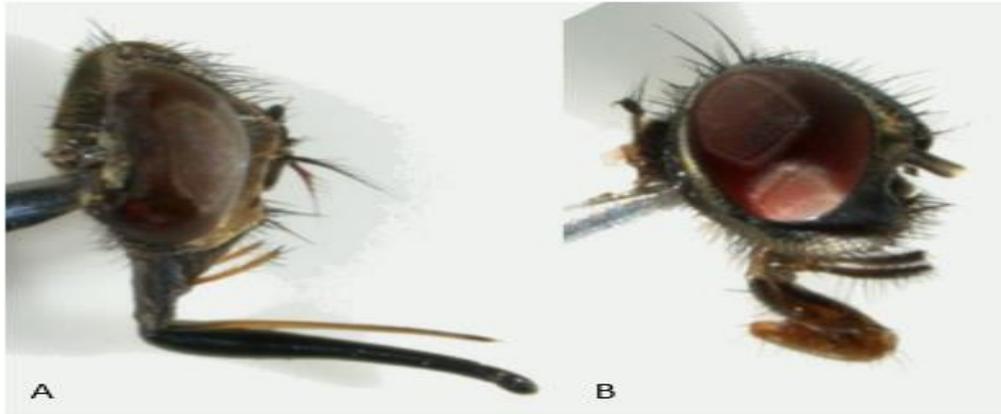
Le principal mode de transmission du *SPPV* est le contact direct entre un animal infectieux et un animal sensible. Le virus se transmet dans les gouttelettes / aérosols par la toux, les éternuements, les secousses de la tête, les vocalisations et la respiration. Les animaux naïfs acquièrent le virus par inhalation, par voie orale ou par abrasions cutanées (**Babiuk et al., 2008**).

#### - Transmission par vecteur

Les stomoxes et plus précisément *Stomoxys calcitrans* (Fig.3) sont responsable de la transmission du *SPPV* et *GTPV* qui évoluent et/ou se multiplient dans l'insecte, on parle alors de vecteur biologique. Soit l'agent pathogène n'évolue pas et ne se multiplie pas à l'intérieur de l'insecte, c'est alors un vecteur mécanique où l'insecte joue le même rôle qu'une aiguille souillée (Fig.4) qui va inoculer un agent pathogène à partir d'un animal malade vers un animal sain (**Scoles et al., 2008**).



**Figure 3** : Image du vecteur de la famille des Muscidae : *Stomoxys calcitrans* et *Musca domestica* (**Salem et al., 2012**).



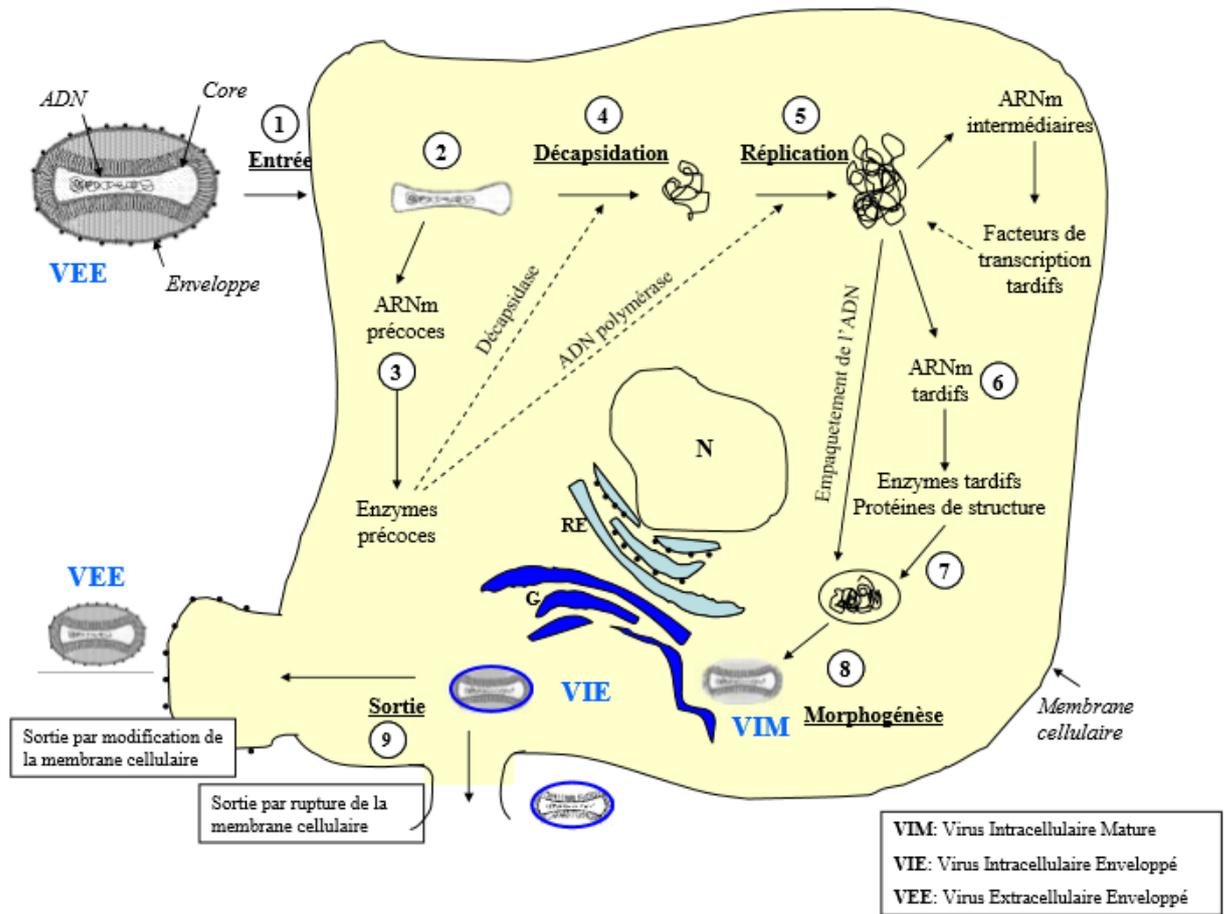
**Figure 4** : Image d'un Proboscis de type piqueur de *S.calcitrans* (A) et de type lécheur de *M.domestica* (B) (Salem et al., 2012).

### 7-Cycle de réplication virale

Fait unique chez les virus à ADN, la réplication des *Poxvirus* (Fig.5) se déroule dans son intégralité dans le cytoplasme des cellules qu'ils infectent (Moss, 1996) et sa durée varie selon la nature du virus et l'origine de la cellule :

- Après liaison du virus à la membrane de la cellule cible, le virus entre dans celle-ci par endocytose (1).
- Sous l'effet d'enzymes du lysosome cellulaire, le virus subit une première décapsidation qui met à nu le core (2). Une partie de l'ADN viral est transcrit en ARN messagers précoces (3) par une transcriptase d'origine virale ; ces ARNm sont traduits en enzymes précoces dont une décapsidase virale et une ADN polymérase.
- Sous l'effet de cette décapsidase, une deuxième décapsidation a lieu et l'ADN viral est totalement libéré (4).
- L'ADN viral se réplique alors dans le cytoplasme à l'aide de la polymérase (5).
- La synthèse des protéines de la cellule hôte est rapidement et efficacement inhibée au profit de la genèse des virions. Les gènes intermédiaires et tardifs sont ensuite exprimés (6) aboutissant à la synthèse des protéines de structure (7).
- La morphogénèse des virions se déroule à proximité du noyau de la cellule (8) aboutissant à une première forme infectieuse (VIM). Les VIM sont ensuite enveloppés par une membrane issue de l'appareil de Golgi (G) et s'arrangent en une nouvelle forme de virion appelée (VIE).
- La sortie du virus de la cellule peut s'effectuer de deux manières (9) ; soit par rupture de la membrane cellulaire soit par fusion du virus avec la membrane cellulaire et sortie sous une forme de (VEE).

# Etude bibliographique



**Figure 5 :** Représentation schématique du cycle de répliation viral d'un *Poxvirus* (Moss, 1991).

## Partie 2 : Etude du pouvoir pathogène (La clavelée)

### 1-Definition de la clavelée

La clavelée et la variole caprine affectent les chèvres et les moutons de tous les âges, des deux sexes et de toutes les races, mais sont plus fréquents et plus graves chez les sujets âgés et jeunes. Les animaux jeunes et exotiques sont plus susceptibles que les adultes et les races autochtones (Heine et al., 1999).

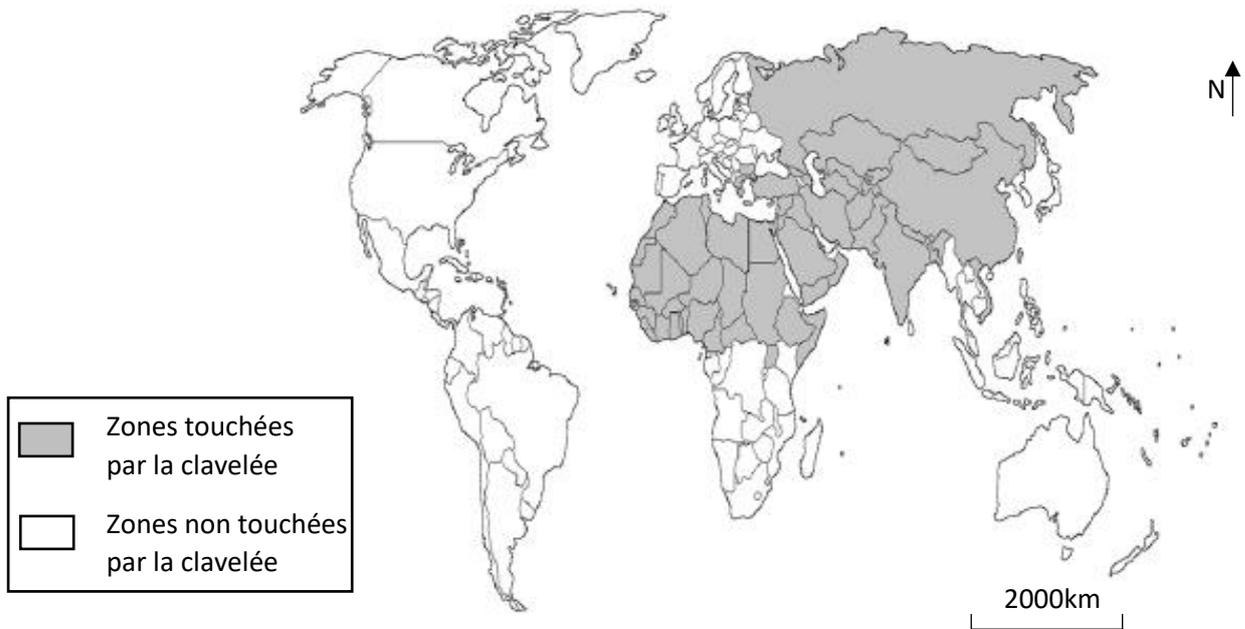
### 2-Impact économique

Clavelée et variole caprine sont des maladies infectieuses systémiques des petits ruminants qui affectent l'économie agricole et les moyens de subsistance des agriculteurs dans les régions d'endémie. Les maladies à *Capripoxvirus* doivent être déclarées à l'Office international des épizooties et à l'enzootique dans de nombreuses régions d'Afrique, du Moyen-Orient et d'Asie, y compris le sous-continent indien, avec possibilité d'incursion en Europe depuis des régions du Moyen-Orient en tant que transport d'animaux infectés. Ils provoquent une morbidité élevée (75-100%) et une mortalité (50-100%) chez les ovins et les caprins affectés. Ils entraînent de lourdes pertes économiques pour le secteur de l'élevage, affectant les petits agriculteurs et les agriculteurs marginaux des pays en développement (Aparna et al., 2016).

### 3-Répartition géographique

En 1879, Hansen signala pour la première fois la variole caprine en Norvège (Rafyi et Ramyar, 1959). Alors que la clavelée était originaire d'Asie centrale et s'était étendu à de nombreux pays occidentaux (Hutyra et al., 1946). En Inde, la variole caprine a été signalée pour la première fois en 1936 par l'Institut indien de recherche vétérinaire d'Izatnagar (Institut impérial de recherche vétérinaire). La variole caprine a également été rapportée comme une infection mixte avec PPR ou Orf simultanément ou par co-infection chez les caprins (Malik et al., 2011 ; Vankatesan et al., 2014).

Globalement, l'aire de répartition inclut l'Afrique au-dessus de l'équateur, le Moyen-Orient, la Turquie, l'Iran, l'Irak et la plupart des sous-continent indiens, y compris la Chine, et des foyers occasionnels se produisent dans des régions de l'Europe situées autour du Moyen-Orient, telles que la Turquie, la Grèce et la Bulgarie (Bhanupraksh et al., 2011). Les foyers les plus récents sont apparus au Vietnam en 2005, en Azerbaïdjan en 2009, en Turquie, en Bulgarie et en Mongolie (Beard et al., 2010) en 2008 et 2009 et au Maroc en 2014 (Zro et al., 2014).



**Figure 6 :** Répartition mondiale de la clavelée et variole caprine (Aparna et al., 2016).

### 4-Symptômes

Les termes de clavelée (*clavus* = clou), de variole (*varius* = tacheté), évoquant les lésions indélébiles séculaires, semblables à celles de la variole humaine (Joubert, 2019).

La clavelée est connue sous diverses dénominations :

Arabe : Jedri el ghanam ; Latin : variola ovina ; Anglais : sheep pox ; Italien : vaiculo ovino ; Allmand : Schafpochen (Fassi-Fehri, 1988).

Après inhalation ou contamination de plaies cutanées, le virus se multiplie au niveau des nœuds lymphatiques loco-régionaux ou des poumons. Cette période d'incubation dure de 6 à 10 jours (extrêmes à 4 jours et 3 semaines) Il s'en suit une virémie, avec généralisation de l'infection (Fassi-Fehri et Lefevre, 2003).

#### - Chez la chèvre

Apparition des tâches circulaires, hyperémie, sur les zones glabres ou dépourvues de laine (Fig.7A). On y'observe des papules érythémateuses ou des vésicules évoluant vers des pustules, et enfin des croûtes. Ces dernières, jaunâtres, denses et arrondies, sont retrouvées tout particulièrement sur les lèvres, les naseaux et dans la bouche (Fig.7B). Les lésions présentes dans la cavité buccale tendent à s'ulcérer. Avec le temps, les lésions progressent et viennent envahir la tête (Fig.7C), les pavillons auriculaires, le cou, les régions axillaire, et inguinale, le périnée et la partie ventrale de la queue. Dans certains cas, les lésions se limitent aux lèvres et au mufler, alors

## Etude bibliographique

que dans d'autres elles n'atteignent que la mamelle (Fig.7D), le scrotum, le prépuce, le périnée et la partie ventrale de la queue (Scott, 2007).



**Figure 7 :** Symptôme de variole caprine chez la chèvre. (<http://www.cfsph.iastate.edu/>, 2014-2019)

**A :** hyperémie, **B :** papules érythémateuses, **C :** Lésion sur mamelle, **D :** Lésion sur la tête.

### - Chez le mouton

Un syndrome fébrile avec de l'hyperthermie (40-42°C), anorexie, tremblements et polypnée, ainsi qu'une rhinite et une conjonctivite, avec un jetage nasal et oculaire abondant (Thiry, 2007). Certains animaux présentent un œdème palpébral et une photophobie (Fassi-Fehri et Lefevre, 2003).

Un a deux jours plus tard des petits points rouges apparaissent sur les muqueuses visibles (l'intérieur des narines, de la bouche et de la vulve) et avec une peau inguinale (Fig.8G), tout particulièrement sur les parties du corps où la peau est fine (la tête, le cou, la face interne des membres et le dessous de la queue). Au cours des deux semaines qui suivent, ces points évoluent en nodules, puis, lorsque l'évolution est complète, en éruption de pustules qui finissent par couvrir de croûtes qui ressemblent à des clous incrustés dans la peau (Bhanuprakash et al., 2006 ; Hunter et al., 2006 ; Scott, 2007 ; Touzani, 2012).

Des lésions cutanées, nodulaires et croûteuses entre les naseaux et les lèvres (Fig.8F) n'apparaissent qu'un à deux jours plus tard. Les vésicules sont rares, et ce sont plutôt des macules

## Etude bibliographique

érythémateuses, des papules (Fig.8E), des nodules et des pustules qui suintent et s'encroûtent. (Sherman et Smith, 2009).



**Figure 8** : Symptômes de la clavelée chez le mouton (<http://www.cfsph.iastate.edu/> , 2014-2019)

### 5-Différentes souches du virus dans le monde

Il existe différentes appellations du *Capripoxvirus* dans le monde ainsi que dans l'Algérie qui sont cités ci-dessus :

#### - Dans le monde :

Un certain nombre de souches / isolats de variole ovine ont été documentés dans la littérature, ces souches ont été nommées essentiellement en fonction du lieu d'isolement (Tableau 2). Dont certains ont été utilisés comme vaccins après atténuation dans différents systèmes de culture cellulaire à différents niveaux de passage et ont trouvé des candidats efficaces pour la vaccination (Bhanuprakash et al., 2006).

## Etude bibliographique

**Tableau 2 :** Les différentes souches de virus claveleux isolées dans le monde  
(Bhanuprakash et al., 2006).

Nom de la souche	Lieu / pays d'isolement
Romania,Roumanian-fenar	Roumanie
Cairo	Egypte
Persian	Iran
Mongolian	Mongolie
Russian	Russie
Turkey	Turquie
Chinese	Chine
Ranped, Jaipur, Hydrabed, Mysore, Karnal, Mathura, Indo-China	Inde
K Strain	Kenya
Perego M	Algerie
RM/65	Yougoslavie
Kazakhstan	Kazakhstan
Starvopol,, Nairobi, Kenya	Kenya
SP8, Pakistan, A1 strain , Oendie, Kedong, Soba, Bucarest , Bakirkoy	Pakistan
Pendic,SPV/RH, Mauritania, Chitinsk	Mauritanie
Algerian	Algérie

- **En Algérie**

Différentes souches de *Capripoxvirus* ont été isolé en Algérie (Tableau 3), ces souches ont été nommées essentiellement en fonction du lieu d'isolement.

**Tableau 3 :** Souches de virus claveleux isolées en Algérie (Lamien et al., 2011).

Nom de la souche	Origine	Espèce d'origine	Source
SPPV Algérie/ 93 Djelfa	Algérie	ovin	IMNV-LCV/Algérie
SPPV Algérie/05 Illizi	Algérie	ovin	IMNV-LCV/Algérie
SPPV Médéa	Algérie	ovin	INMV-LCV/Algérie
SPPV El Bayadh 1	Algérie	ovin	INMV-LCV/Algérie
SPPV El Bayadh 2	Algérie	ovin	INMV-LCV/Algérie

## Etude bibliographique

### 6-Situation zoo sanitaire en Algérie

La maîtrise de la communication par les services vétérinaires est devenue de nos jours une nécessité impérieuse, vu son importance pour la protection de la santé animale. Elle permet d'agir sur les comportements et de ce fait, la communication est un outil important dans l'aide à la décision pour la gestion des crises en matière de santé animale (**Anonyme, 2011**).

**Tableau 4** : Synthèse de la situation sanitaire de la clavelée en Algérie de 2004 jusqu'au 2013 (**Bulletins sanitaires annuels, DSV Algérie 2004-2013 ; Kali, 2014**)

Année	Tête vaccinées	Couverture vaccinale	Nombre de foyers	Wilayas touchées
2004	10 967 900	62%	37	Naama, Tebessa, Sétif, Tissemsilt, Chelef, Adrar, Annaba, Ourgla.
2005	12 966 675	69.18%	10	Blida, Chelef, Djelfa, Naama, Sidi-Belabbes, Tamanrasset, Tebessa.
2006	14 304 481	75.79%	04	-
2007	14 030 129	74.33%	13	El bayadh, Laghouat, Msila, Medea, Oum el bouaghi.
2008	16 616 127	86.64%	61	Batna, Blida, Chelef, Djelfa, EL oued, Msila, Medea, Oum el bouaghi, Sétif, Tipaza.
2009	15 825 229	80.68%	57	Naama, Biskra, El oued, Khenchela, Tebessa, Sétif.
2010	16 466 510	83.95%	37	KKhenchela, Médea, Oum el Bouaghi, Sétif, Batna, Biskra, Chelef, El bayadh, EL oued, Khenchela, Naama.
2011	17 438 567	88.90%	41	Batna, Biskra, Chelef, El bayadh, El oued, Khenchela, Naama
2012	17 963 868	78.55%	43	Batna, Blida, Boumerdes, El oued, Msila, Oum El bouaghi, Saida, Tebessa, Tipaza.
2013	19 312 672	81.23%	31	Batna, El bayadh, Khenchela, Msila, Médea, Naama, Oum El bouaghi.

## Partie 3 : Production de vaccin

### 1-Historique de la vaccination

Le premier vaccin est né au XVIII<sup>ème</sup> siècle, il s'agit du vaccin contre la variole. Il a été découvert par un médecin anglais, Edward Jenner, qui avait remarqué que les vachers des fermes anglaises ne contractaient pas la variole, mais en affichaient des symptômes atténués (pustules au niveau des avant-bras). Ces vachers étaient en fait atteints de vaccine, maladie proche de la variole mais moins sévère, transmise par les animaux. Jenner a eu l'idée d'inoculer le liquide purulent d'une lésion de vaccine à une personne saine. Cette inoculation a entraîné une production d'anticorps protecteurs contre la variole, dans la mesure où les virus de la vaccine et de la variole étaient morphologiquement proches. Ce fut la première immunisation rationnelle organisée (Anonyme, 2008).

Mais il a fallu, en réalité attendre Louis Pasteur, un siècle plus tard pour l'établissement scientifique du principe général de la vaccination. Il consistait à l'atténuation de la virulence du germe pathogène en laboratoire aboutissant à de nombreuses applications dont la première vaccination antirabique humaine administrée avec succès à l'enfant Joseph Meister en 1885, sévèrement mordu par un chien atteint de rage. Par la suite, de nombreux autres vaccins ont été réalisés (Tableau 4) (Ajjan et al., 2009)

**Tableau 5** : Dates et développements des différents vaccins (Ajjan et al., 2009).

Année	Vaccin développé
<b>XVIII<sup>e</sup> siècle</b>	
1798	Variole
<b>XIX<sup>e</sup> siècle</b>	
1885	Rage
1896	Typhoïde, choléra
<b>XX<sup>e</sup> siècle</b>	
1923	Anatoxine diphtérique
1926	Anatoxine tétanique
1927	BCG
1936	Fièvre jaune
1945	Grippe
1955	Poliomyélite
1963	Rougeole
1967	Oreillons
1969	Rubéole
1980	<i>Haemophilus influenzae b</i> conjugué
1981	Hépatite B
1992	Encéphalite japonaise
1995	Varicelle, hépatite A
1998	Rotavirus
<b>XXI<sup>e</sup> siècle</b>	
2006-2007	Papillomavirus

## 2-Principe de la vaccination

La vaccination consiste en l'inoculation, à un individu généralement sain, d'un agent pathogène (bactérie, virus...) doté d'un pouvoir infectieux non susceptible d'entraîner une contamination de l'hôte. L'inoculation de l'agent infectieux au sein de l'organisme de l'individu sain permet de stimuler son système immunitaire. Pour cela, l'agent pathogène doit être rendu inoffensif (par atténuation ou inactivation). Ainsi, lors d'un contact ultérieur avec le même agent pathogène, cet individu sera capable de se défendre grâce au principe de « mémoire immunitaire ». C'est ainsi que la vaccination reproduit en toute innocuité l'état immunitaire secondaire à une maladie, sans exposition au risque infectieux (Faure, 2013).

L'objectif de la vaccination est donc de permettre à l'individu de développer une protection active spécifique vis-à-vis d'un agent pathogène en utilisant les ressources naturelles de l'immunité anti-infectieuse (production d'anticorps et de cellules spécifiques d'antigènes), sans donner lieu aux symptômes et complications qui se développent lorsque l'on est sujet à l'infection. La vaccination réalise ainsi une immunoprophylaxie active. La protection qu'elle induit est différée et durable (Pilly et al., 2009).

## 3-Types de vaccins

### 3-1-Vaccins atténués

#### A-Vaccins vivants atténués

Les vaccins vivants atténués sont les vaccins les plus couramment utilisés en médecine vétérinaire ou on utilise des souches vivantes d'un virus ou d'une bactérie, dont on a supprimé le pouvoir pathogène tout en ayant conservé leur caractère antigénique. Ils gardent la capacité à se multiplier dans l'organisme. Donc Ils contiennent une forme intacte et viable de l'agent infectieux qui a été "atténué" pour réduire sa virulence (Michael et al., 2011).

L'atténuation de ce type de vaccin s'obtient en multipliant les « passages » sur des milieux de culture, c'est-à-dire en cultivant le microorganisme pendant un certain temps, en le prélevant pour le cultiver à nouveau, et ainsi de suite jusqu'à ce que des mutations apparaissent qui suppriment la pathogénicité. Ces vaccins présentent plusieurs inconvénients. Etant des produits biologiques vivants, ils doivent être conservés à basse température, ce qui impose un strict respect de la chaîne du froid. Leur pouvoir pathogène n'est pas totalement nul, ils sont donc contre indiqués chez les personnes immunodéprimées. Une seule dose vaccinale est généralement suffisante et l'immunité persiste longtemps. Par ailleurs, la souche vaccinale peut être transmise

---

## Etude bibliographique

---

spontanément d'un individu à l'autre, élargissant ainsi la couverture vaccinale, c'est ce qu'on appelle l'immunité de groupe (**Bertrand et al., 2006**).

### **B-Vaccins vectorisés**

Un des développements les plus récents en vaccinologie vétérinaire est l'utilisation de vaccins vectorisés. Après isolement des gènes de l'agent pathogène impliqués dans l'induction d'une réponse immunitaire, ceux-ci sont incorporés au sein d'un organisme vecteur (virus : Poxvirus, Adénovirus, herpesvirus... ou bactéries : salmonelles, BCG...). Les vecteurs ont eux-mêmes été modifiés afin de ne plus présenter de pouvoir pathogène. Ils expriment le gène au sein de l'hôte. Cette méthode induit des réponses immunitaires protectrices très puissantes et sont capables d'induire une immunité même en présence de niveaux élevés d'immunoglobulines d'origine maternelle. Ces vaccins ont l'avantage de ne pas nécessiter l'ajout d'un adjuvant (**Michael et al., 2011**).

### **C-Vaccins à ADN**

Les derniers vaccins apparus sont les vaccins à ADN nu. Ces vaccins contiennent un fragment d'ADN codant pour un gène d'intérêt du pathogène qui est inséré dans un plasmide bactérien. Il est directement injecté dans l'animal, sans utilisation de vecteur. Les plasmides peuvent être administrés par injection, par voie muqueuse (avec protecteurs appropriés) ou par voie percutanée. La vaccination par ADN nu déclenche une réponse immunitaire mixte très puissante (RIMH et RIMC), ce qui permet une protection efficace (**Michael et al., 2011**).

## **3-2-Les vaccins inertes**

Les vaccins inertes sont de 3 types :

### **A-Vaccins inactivés**

Il s'agit d'agent inactivé par procédé physique ou chimique. Les vaccins inactivés ont l'avantage d'éliminer tout risque lié au caractère infectieux. C'est la raison pour laquelle ils peuvent être utilisés chez les personnes immunodéprimées. Etant des produits inertes, ils sont plus stables que les vaccins vivants. Si leur stockage et leur transport doivent respecter la chaîne du froid, des écarts plus importants peuvent être tolérés. Ils présentent, cependant, l'inconvénient de susciter une réponse immunitaire souvent plus limitée et de moins longue durée que les vaccins vivants, ce qui oblige à répéter la vaccination (les rappels). La réponse immunitaire cellulaire est en particulier meilleure avec les vaccins vivants (**Bertrand et al., 2006**).

## **B-Vaccins sous unitaires**

C'est un vaccin contenant des protéines de l'agent pathogène capables d'induire une réponse immunitaire protectrice. Après identification de ces protéines immunogènes, elles sont obtenues par différentes techniques (**Day et Schultz, 2011**) :

- Obtention par purification à partir de l'agent pathogène : Cette approche permet de limiter la part de protéines non nécessaires dans un vaccin et peut limiter le nombre de réactions indésirables.

- Obtention par génie génétique : le gène codant pour la protéine immunogène est inséré dans un hôte récepteur (bactérie, levure, cellules en culture) qui produit ces protéines. La protéine est ensuite récoltée, purifiée et incorporée dans un vaccin.

## **3-3-Fractions antigéniques**

Les fractions antigéniques (ou vaccins synthétiques) sont produites par génie génétique qui permet la reproduction de fragments immunogènes des agents microbiens. Ces antigènes peuvent être de nature protéique ou polysaccharidique conjuguée adsorbée (**Faure, 2013**).

## **4-Types de production**

Il existe différentes technologies de procédés qui permettent d'obtenir des vaccins viraux :

### **4-1-Production par ovoculture**

C'est une production qui correspond à la culture de virus sur des œufs embryonnés. Une des particularités de cette technique de culture consiste en la présence de traces de protéines d'œufs (albumine et ovalbumine) dans le produit fini, même après extraction. Les personnes allergiques aux œufs sont donc exposées à un risque supplémentaire et potentiellement très dangereux lors de la vaccination (**Duigou, 2005**).

### **4-2-Production en bioréacteur**

Ce procédé correspond à la culture de micro-organismes dans des fermenteurs de grands volumes (**Perrin et al., 1995 ; Duigou, 2005 ; Mattos et al., 2015**).

### **4-3-Production en monocouche**

La production en monocouche, appelée aussi production en monolayer correspond à la mise en culture dans des flacons de culture, les cellules se fixant aux parois du flacon (**Perrin et al., 1995**).

## 5-Culture cellulaire

### 5-1-Principe et historique

Selon **Magniez Frédéric (2008)**, 3 périodes ont marqué le développement de la culture cellulaire :

**La période des précurseurs (1885, 1900)**. Cette période annonce la première méthode de culture de tissu en dehors du corps, grâce au **Professeur Ross Harrison** qui a pu cultiver des neuroblastes de grenouille dans un milieu de lymphes et ainsi franchit un premier pas vers la recherche actuelle sur les cellules souches et dérivées.

**Ensuite vient la période de la culture de tissus (à partir de 1902)**. Cette période est dominée par **Alexis Carrel** qui oriente le développement de la culture de tissus suivant 3 voies principales :

- L'amélioration des techniques d'obtention des tissus.
- L'élaboration des règles d'aseptie.
- L'étude des besoins nutritionnels.

**Puis vient la période où l'on considère que la culture cellulaire apparaît proprement dite qu'à partir de 1952** lors de l'introduction de la trypsinisation des tissus par **Moscona en 1952**. Il procéda à la digestion de tissu d'œuf de poulet avec de la trypsine afin d'obtenir des cellules isolées ou des amas de cellules capables de se diviser in-vitro.

La culture cellulaire et tissulaire mise au point au début du XX<sup>ème</sup> siècle est un processus artificiel de croissance, de prolifération et de maintien de cellules destinées à l'étude et à la recherche sur le comportement de diverses cellules animales (**Freshney, 1998 ; Durrani et al., 2015**).

La culture cellulaire est principalement appliquée aux sciences biologiques telles que la propagation de virus, la production de vaccins, le diagnostic, la production d'hormones, études physiologiques, biologiques, pharmaceutiques, fondamentales, recherches appliquées, notamment biologie cellulaire, physiologie, pharmacologie et toxicologie, production de protéines recombinantes, thérapie génique, recherche sur le cancer, développement de médicaments, anticorps, interféron, érythropoïétine, facteurs de coagulation, tests de sécurité et de nombreux autres aspects (**Balls et al., 1995 ; Vester et al., 2010 ; Durrani et al., 2015**).

### 5-2-Types de culture cellulaire

La culture cellulaire est classée selon deux systèmes de culture qui sont utilisés pour cultiver des cellules, ils sont essentiellement basés sur l'aptitude des cellules à pousser attachées sur un

## Etude bibliographique

---

substrat de verre ou en plastique traité (système de culture en monocouche des cellules adhérentes) ou à flotter librement dans le milieu de culture (système de culture cellulaire en suspension) (**John, 2014**).

### **A-Système de culture stationnaire ou en monocouche**

Cette méthode de culture repose sur la propriété des cellules à avoir une affinité particulière pour un type de substrat, leur permettant ainsi d'y adhérer et de s'y développer. Il existe plusieurs types de support permettant la croissance cellulaire : le plus souvent en polystyrène, ils peuvent être également recouverts de diverses substances physiologiques favorisant le développement des cellules (**Langdon, 2004**).

Il existe trois systèmes différents de culture en monocouche (**Adolphe, 1988**) :

- Les systèmes clos où les flacons sont placés dans des étuves classiques de type bactériologique. Si aucun renouvellement du milieu n'est effectué, on observe un appauvrissement des facteurs nutritifs avec modification du pH et de l'environnement gazeux, particulièrement néfastes pour la culture surtout si le tampon utilisé est le tampon bicarbonate.
- Les systèmes semi-clos constitués de boîtes de Pétri ou microplaques placées dans des étuves permettant un renouvellement permanent de l'atmosphère gazeuse (95% air, 5% CO<sub>2</sub>). Ce système permet une meilleure régulation du pH et de l'environnement gazeux.
- Les systèmes ouverts ou de perfusion : chambre de culture de type Pomerat, Rose ou Sykes et Moore. Ces systèmes ne sont utilisables que pour un petit nombre de cellules et pour des études nécessitant une observation en microscopie photonique.

### **B- Système de culture en suspension**

Au sein de ces cultures, les cellules ne sont pas adhérentes à un support mais sont en suspension dans un milieu qui est en constante agitation, évitant ainsi que les cellules ne se déposent et se développent sur le récipient. Ce système est principalement utilisé dans le cas de l'industrie cellulaire en masse, notamment dans la virologie ou la biotechnologie, avec la production de substances biologiques par les cellules en culture et la possibilité de cultiver des cellules en plus grande quantité (**Adolphe, 1988**).

### **5-3-Types de lignée cellulaire**

On distingue deux types de lignée cellulaire pour la production de vaccin :

## 5-3-1-Lignées cellulaires primaires

On utilise couramment des tissus d'animaux normaux (comme la peau, les reins, le foie) ou des embryons entiers pour établir des cultures cellulaires primaires (**Lodish et al., 2005**) mais leur difficulté d'obtention et de maintien pendant un temps très court limite leur emploi (**Barlovatz-Meimon et Xavier, 2014**). Cependant, lorsque les cellules prélevées sur un embryon ou animal adulte sont mise en culture, la plupart des cellules adhésives se divisent en un nombre fini de fois puis cessent de croître (sénescence cellulaire), par exemple, les fibroblastes de fœtus humain se divisent environ 50 fois avant d'interrompre leur croissance. Une lignée de cellules provenant d'une même culture primaire est appelée souche cellulaire (**Lodish et al., 2005**).

### 5-3-1-1-Exemple de lignées cellulaires primaires : cellules de rein de mouton (R.M.)

Les reins récoltés à partir des fœtus récupérés aux abattoirs sont débarrassés de leurs enveloppes, grattés de leur cortex et éliminés de leur médulla, le cortex est ensuite découpé en petits fragments. On lave plusieurs fois à l'aide d'une solution tampon et son soumet à une digestion enzymatique, la suspension cellulaire récoltée est centrifugée et le culot cellulaire est ensuite repris dans une quantité adéquate de milieu de croissance additionnée de sérum de veau fœtal, répartie en flacon de plastiques qui sont incubés à 37°C. Par ce procédé, un tapis cellulaire complet est obtenu au bout de 4 à 5 jours d'incubation. Selon le cas, ces cellules sont soitensemencé directement avec le virus, soit soumise à une trypsination afin de préparer des subcultures. (**Fassi-Fehri et al., 1983 ; Mirakabadi et Moradhaseli, 2013**). On peut aussi utiliser des cellules de 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> subcultures dans le but d'évaluer une éventuelle modification de l'effet cytopathogène (E.C.P) ou du titre virale (**Fassi-Fehri et al., 1983 ; Mirakabadi et Moradhaseli, 2013**).

## 5-3-2-Lignées cellulaires immortelles

Il s'agit de cellules immortelles (à prolifération continue) ; elles peuvent provenir de tissus d'origine humaine (Human nasopharygeal carcinoma..), ou animales (chiens :MDCK, bovins : MDBK, Vero..). Contrairement aux cellules primaires souvent limité à une ou deux générations, elles permettent un nombre quasiment infini de subculture (**Mamettes, 2002**), c'est des cellules sélectionnées pour leur caractéristiques connu et notamment pour leurs capacités à recevoir le virus inoculé et pour leur aptitude à se multiplier dans des conditions de culture classiques (**Douigou, 2005 ; Barret et al., 2009**).

Elles sont aneuploïdes car elles possèdent souvent des chromosomes avec des structures anormales. De plus que le nombre dans ces cellules est généralement supérieur à celui de la culture

## Etude bibliographique

normale dont ils sont issus, le nombre de leurs chromosomes augmente et diminue et à mesure de la division des cellules en culture. (Lodish et al., 2005 ; Barret, 2009).

### 5-3-2-1-Exemple de lignées cellulaires immortelles : cellules de rein d'Hamster (BHK-21)

#### A-Origine et historique

Crée en 1966 Cellules par I.A Macpherson et M.G.P Stoker dérivée des reins de 5 hamsters doré syriens âgés d'un jour et non sexés de la portée numéro 21 appartenant à l'espèce *Mesocricetus auratus*. Depuis lors, cette lignée cellulaire est devenue un standard de laboratoire pour la croissance d'innombrables virus et l'étude de nombreux processus biologiques (Hernandez et Brown, 2010).

#### B-Caractéristiques

Les principales caractéristiques de cette lignée (BHK-21) sont représentées ci-dessous dans le (Tableau 6).

**Tableau 6 : Caractéristiques des cellules BHK-21 (Macpherson et Stoker, 1962 ; Anonyme, 2019).**

<b>Origine</b>	Rein d'hamster, syrien doré, <i>Mesocricetus auratus</i> .	
<b>Mode de croissance</b>	Adhérente.	
<b>Mode de culture</b>	Monocouche (en suspension).	
<b>Caryotype</b>	2n = 44. Il s'agit d'une ligne pseudodiploïde dont la tétraploïdie se produit à 4%. Le caryotype est 44, XY, -6, -15,6q+, 15q+ dans la majorité des cellules.	
<b>Morphologie</b>	De type fibroblaste : cellules plates et allongées qui présentent des processus cytoplasmiques étendus sur la longueur de la cellule et des noyaux plats de forme ovale.	
<b>Conditions de culture cellulaire</b>	<b>Milieu de culture</b>	EMEM ou DMEM à 10% SVF.
	<b>Conditions de culture</b>	pH de 7,2 et une température de 37°C.
	<b>Méthode de Passage</b>	Les cellules sont traitées avec 0,02% d'EDTA et 0,25% de trypsine.
	<b>Cryoconservation</b>	Milieu de croissance complet 95% ; DMSO, 5%.

## Etude bibliographique

		Stockage en phase vapeur d'azote liquide.
	<b>Repiquage (sub-culture)</b>	Cultures fractionnées sous-confluentes (70-80%), c'est-à-dire ensemencement à $2-4 \times 10^6$ cellules/cm <sup>2</sup> en utilisant 0,25% de trypsine / EDTA; 5% de CO <sub>2</sub> à 37 ° C.
<b>Permissivité au virus</b>	Human adenovirus 25, Reovirus 3, Vesicular stomatitis virus, Human poliovirus 2, Rubeole, virus vaccinia ...ect.	
<b>Référence ATCC</b>	CCL-10 <sup>TM</sup>	

### 5-4-Etablissement des lignées cellulaires

La croissance d'une lignée cellulaire présente plusieurs phases bien distinctes, caractérisées notamment par la vitesse spécifique de croissance  $\mu$ . Cette courbe de croissance est très caractéristique aux lignées cellulaires entre chaque repiquage ou passage effectué (Fig.9) (Langdon, 2004) :

- **Phase de latence « ou adaptation » (1)** : caractérisée par une faible croissance cellulaire en raison d'une mauvaise adhérence au substrat et des dommages cellulaires engendrés par l'action de la trypsine au cours du repiquage. De courte durée en générale, où les cellules se fixent au plastique, réorganisent leur cytosquelette et s'étalent (Densité cellulaire =  $\mu$ ).

- **Phase d'accélération (2)** : les cellules commencent à se multiplier ( $\mu$  = augmente).

- **Phase exponentielle (3)** : où l'augmentation croissante du nombre de cellules rentrant en division, associée à une sécrétion paracrine de facteurs de croissance, permet une augmentation brutale du taux de croissance. Cette phase dépend de la densité cellulaire initiale au sein de la culture : en effet, plus celle-ci est élevée, plus la phase exponentielle sera précoce et rapide ( $\mu$  = maximale et constante).

- **Phase décélération (4)** : courte période où certaines cellules meurent, le milieu s'étant appauvri et/ou devenant hostile ( $\mu$  = diminue).

- **Phase stationnaire (5)** : lorsque les cellules arrivent à confluence, on observe un ralentissement de la croissance cellulaire qui se stabilise, et qui mène à équilibre entre la mort et la multiplication cellulaire ( $\mu$  = nulle)

## Etude bibliographique

- **Phase de déclin (6)** : lorsqu'il y'a plus de morts que de multiplication, le milieu devient trop toxique (déchet) avec carence de nutriment ( $\mu$  =négative).

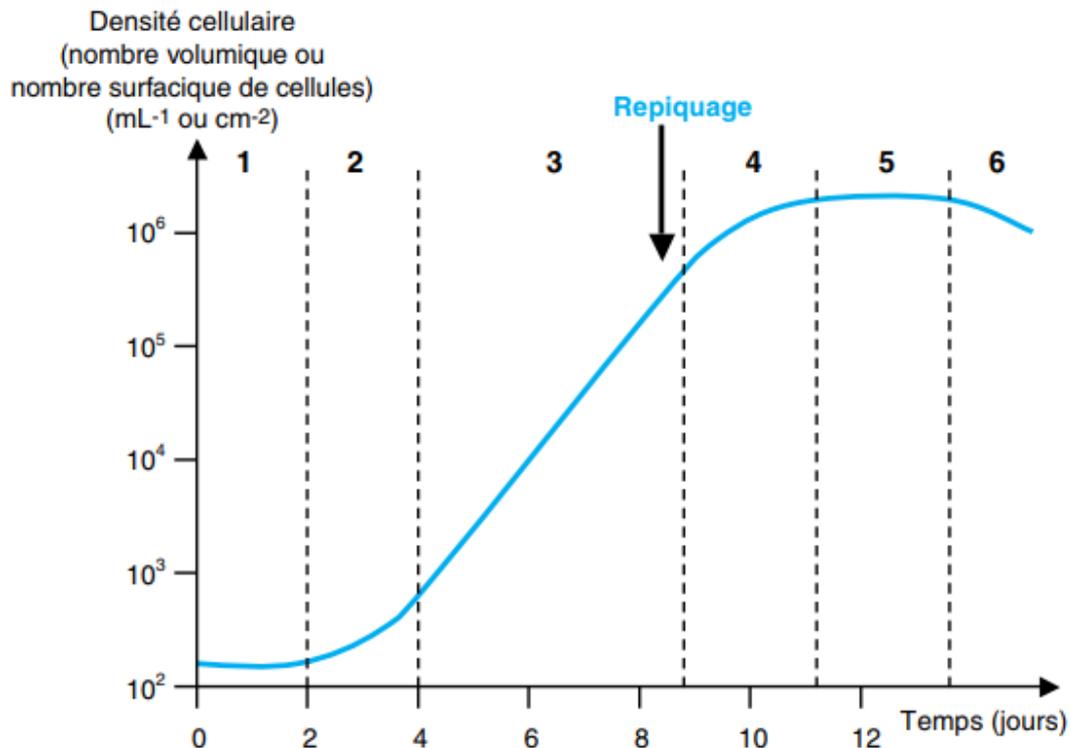


Figure 9 : Courbe de croissance d'une lignée cellulaire (Cezard, 2013b).

### 5-4-1-Repiquage

Le repiquage, ou encore « passage », est une technique de culture cellulaire réalisée dès lors que les cellules recouvrent 80 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).

Par le biais d'une dilution des cellules, précédée ou non d'une étape de dissociation enzymatique selon le procédé de culture, elle permet ainsi une diminution de la densité cellulaire afin de maintenir une croissance optimale. Cette technique constitue la première étape menant à une lignée cellulaire, et est indispensable pour le maintien d'une bonne croissance cellulaire. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, si les cellules arrivent à confluence (100 % de recouvrement), elles rentrent en phase de déclin, synonyme d'une diminution nette de la croissance (Macleod et Langdon, 2004). Or une fois que cette phase est amorcée, même après un repiquage les cellules peuvent ne pas arriver à redémarrer leurs divisions à un taux satisfaisant. C'est pourquoi il est primordial de vérifier régulièrement le recouvrement du flacon de culture et de réaliser les repiquages soit en fin de phase exponentielle, soit en tout début de phase de décélération (70 à 90 % de recouvrement) (Macleod et Langdon, 2004).

### 5-4-2-Isolement viral sur culture cellulaire

L'isolement viral en culture cellulaire est une technique qui constitue la base du diagnostic virologique (**Mammette, 2002**). C'est une technique classique au cours de laquelle les virus présents dans un échantillon se répliquent dans une culture cellulaire *In-Vitro*, réalisée avec des cellules dites « permissives » (capables de subir un cycle replicatif complet du virus en question), il est donc fondé sur l'inoculation de cellules en culture par un échantillon biologique potentiellement infecté par un virus (inoculum). La qualité du prélèvement initial conditionne le résultat 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 du 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. La réplication 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**).

Dans les cas les plus évidents, la réplication virale se traduit par un effet cytopathique (ECP). C'est le témoin, visible en microscopie optique, de la réplication lytique du virus. Les cellules dans les cultures *In-Vitro* (qui sur le support de verre ou de plastique, apparaissent normalement plates, confluentes, peu réfringentes) s'arrondissent, deviennent réfringentes et se détachent du support dans le milieu de culture ; certains virus induisent l'apparition de syncytiums par fusion de la membrane cytoplasmique de cellules voisines, de proche en proche. Cet aspect de l'ECP peut donc être plus ou moins évocateur d'un virus ou d'une famille virale (**Thouvenot et al., 2004**).

### 5-4-3-Permissivité des cellules vers les virus

Quand une cellule ou d'un hôte est défini comme permissif en virologie, il se réfère au fait que le virus est capable de contourner les défenses de l'hôte et est capable de se répliquer.

Habituellement, cela se produit lorsque le virus a modulé un ou plusieurs des défenses cellulaires de l'hôte intrinsèque, et l'hôte du système immunitaire. L'état d'un hôte permissif a maintenant été déterminé à être le principal facteur pour déterminer si un virus provoque des symptômes pathologiques chez un hôte (**Dimmock et Edwards, 2007**).

### 5-4-4-Effet cytopathogène ECP

L'effet cytopathogène dépend du système cellulaire, du support cellulaire, 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**).

Selon **Mammette (2002)** les principaux ECP observés consistent en :

- 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 polynucléés 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 coloration cytologiques.

# **Chapitre 2 : Etude expérimentale**

## Matériels et méthodes

Cette travail a été réalisé au sein du laboratoire de production et de développement des vaccins viraux vétérinaires à l'unité de production de vaccins anti-claveleux au niveau de l'institut Pasteur d'Alger (I.P.A), Annexe Kouba.

### 1-Matériels

#### 1-1-Matériel biologique

##### 1-1-1-Les lignées cellulaires

###### A-Cellules R.M.

Les cellules primaires du rein de mouton fœtal ont été préparées, cultivées et congelées au premier passage dans de l'azote liquide depuis le 12-06-2016 au sein du laboratoire de production et de développement des vaccins viraux vétérinaires, Annexe Kouba, IPA.

###### B-Cellules BHK-21

Les cellules rein du bébé Hamster (BHK-21) proviennent du laboratoire de production de vaccins viraux, qui ont été cryoconservés dans l'azote liquide au 8<sup>ème</sup> passage depuis le 08-10-2010 (Fig.10).

Les cellules sont maintenues dans l'ampoule qui contient un milieu de conservation constitué de SVF et de DMSO (Diméthylsulfoxyde) (Annexe 1).



**Figure 10** : Cryotube contenant les cellules BHK-21 (Original, 2019).

# Etude expérimentale

---

## 1-1-2-Souche virale RM<sub>65</sub>

La souche RM<sub>65</sub> a été fournie dans le cadre d'un transfert de technologie par le Dr Joseph SAAR responsable du laboratoire de référence F.A.O pour l'Afrique, au laboratoire national d'élevage et de recherche vétérinaire de DAKAR (Sénégal)

## 1-2-Milieus et réactifs

- **Milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) :** c'est le milieu de culture cellulaire nécessaire au maintien et à la prolifération des cellules BHK-21. Il s'agit d'un milieu avec L-Glutamine et 4.5g de glucose. Il contient plusieurs composants comme les vitamines, les acides aminés et des sels inorganiques. Au moment de l'utilisation, d'autres éléments ont été additionnés au milieu DMEM tels que : la solution d'antibiotique-antimycosique et le Sérum de veau fœtal (SVF) (**Belmessabih et Hamidouche, 2015**) (Annexe 2).
- **Additif pour le milieu DMEM :**
  - **Sérum de veau fœtal (S.V.F.) :** Le sérum de veau fœtal est dérivé du sang entier coagulé recueilli aseptiquement du fœtus par ponction cardiaque. Le sérum est collecté et/ou importé et traité conformément à la réglementation européenne (**Anonyme, 2016**).

Le SVF possède divers facteurs de croissance qui permettent la prolifération cellulaire, des hormones, des protéines, des vitamines, des facteurs d'attachement et d'adhésion des cellules entre elles, comme la fibronectine (**Asayama et Yao, 2017**) qui contribuent à une bonne adhésion, indispensable à la division cellulaire, et assure un rôle protecteur (**Cézard, 2013a**).

Le SVF est d'abord décomplémenté dans un bain Marie à 56°C pendant 30 min pour dégrader les composants du complément qui peuvent entraîner une réaction immunologique en présence d'anticorps reconnaissant un antigène cellulaire ou viral (**Muller-Eberhard, 1988**), puis il est rajouté au milieu à différentes concentrations : 5% et 10% selon le besoin (**Ben-Messaoud, 2013**).

- **Solution Antibiotique- Antimycosique :** les antibiotiques utilisés sont la gentamycine, la néomycine, et l'amphotéricine B, ces antibiotiques sont fournis sous forme de poudre ensuite 1 ml est ajoutée par un litre de milieu. Cette solution d'Antibiotique est utilisée pour réduire le risque de contamination dans la culture cellulaire (Annexe 3).
- **Trypsine-Vérsène :** La Trypsine(enzyme protéolytique) est solution enzymatique utilisée en culture cellulaire pour détacher et dissocier des cellules adhérentes sur les flasques de culture, elle détruit certaines protéines de liaison et brise ainsi les liens entre les cellules, sans les altérer(**Magniez, 2008**) (Annexe 4).

## Etude expérimentale

- **DMSO** : Le diméthylsulfoxyde est un solvant de formule brute  $C_2H_6OS$ , il est utilisé en culture cellulaire comme conservateur pendant la congélation des cellules

### 1-2-1-Stérilisation et répartition des produits de culture cellulaire

La stérilisation du milieu DMEM, la Trypsine-Vérsène et la Solution antibiotique-antimycosique est un procédé très important. Cette étape nous permet d'éviter toute contamination pour la culture cellulaire (**Harrison et al., 1990**).

Cette stérilisation s'effectue par un traitement physique « filtration » ou « microfiltration » des 3 produits, qui est une méthode habituelle et inévitable de stérilisation des produits de culture tissulaire. La nature thermolabile de nombreux substrats énergétiques utilisés dans les milieux de culture ainsi que dans la Trypsine et la Solution antibiotique- antimycosique (sucre, acide aminé ...etc.) empêche l'utilisation de la stérilisation à la chaleur car cette dernière va les dégrader. La filtration à pression positive à travers des filtres à membrane des d'environ  $0,2\mu m$  est l'approche habituelle.

Ce traitement se déroule en utilisant une pompe à vide/pression, une cuve en inox et un support filtre contenant un filtre  $0,22\mu m$  « MILIPORE » (Fig.11).

Sous une hotte à flux laminaire et dans un rayon de  $15cm$  d'un bec benzène, les liquides (produits utilisés) sont filtrés pour diminuer toutes charge microbienne afin d'éliminer toutes particules indésirables, permettant ainsi d'obtenir à la fin une solution stérile (ex. milieu DMEM, la trypsine, la solution antibiotiques-antimycosique...etc) et qui seront réparties par la suite dans des flacons en verre stériles.



**Figure 11** : Photo d'une cuve en inox liée au support de filtration (**Original, 2019**).

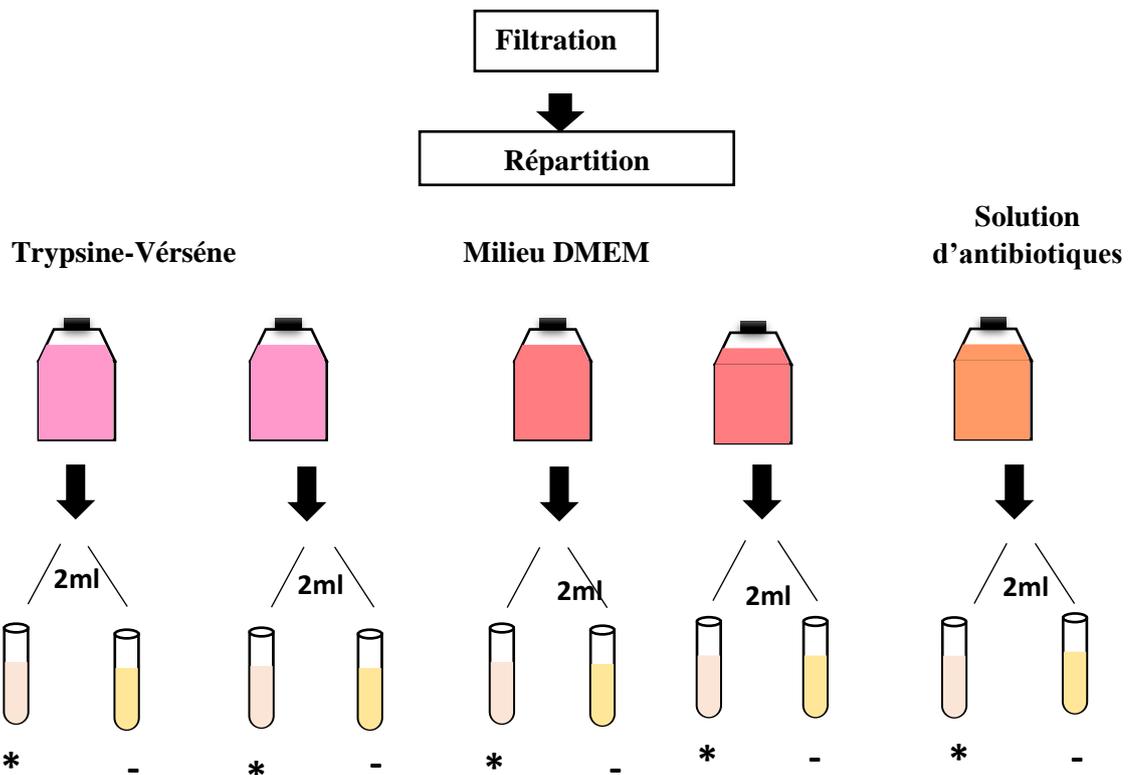
A : support de filtration ; B : cuve en inox

# Etude expérimentale

## 1-2-2-Control de stérilité des produits

Le milieu de culture DMEM utilisé, la Trypsine-Versène et la Solution antibiotique-antimycosique doivent subir un test de stérilité afin de s'assurer de leur innocuité avant d'être utilisé en culture cellulaire (Ben-Messaoud, 2013 ; Anonyme, 2018). Ce contrôle se fait sur les milieux destinés pour la recherche des contaminants de nature bactériologique ou mycosique tel que : le Bouillon Nutritif (B.N.) et le Sabouraud liquide en prélevant 1ml de chaque lot et l'ajouter dans 5ml des milieux de contrôle puis l'incuber pendant 7 jrs à 37°C pour la recherche de germes aérobies et pendant 14 jrs à température ambiante pour la recherche des champignons microscopiques (Fig.12).

Si aucune contamination n'est observée à l'œil nu (milieux non troubles), les milieux sont considérés stériles.



**Figure 12** : Schéma récapitulatif sur la répartition du milieu DMEM et la Trypsine-verséne et antibiotique- antimycosique suivie d'un test de contrôle de stérilité (Original, 2019)

: Bouillon Nutritif liquide à 37°C pendant 48h. - : Sabouraud liquide à température ambiante (25°C) pendant 14js.

# Etude expérimentale

## 2-Méthodes

### 2-1-Conditionnement et stérilisation du matériel

La stérilité est définie par l'absence de micro-organismes viables ou de virus. Elle sera obtenue par l'emploi de techniques d'asepsie et de méthodes de stérilisation validées telles que chaleur, filtration, traitement chimique et l'irradiation, en adéquation avec l'objectif visé. L'absence de contamination est définie comme l'absence de micro-organismes spécifiés viables pour cela. Des tests des produits en cours de production sont nécessaires pour garantir que ces contrôles soient bien réalisés (Anonyme, 2018).

Un conditionnement de tout le matériel doit être fait avant de passer à la stérilisation.

#### 2-1-1-Conditionnement du matériel

- **Cuve en inox** : fonctionne avec un débit moyen, pousser le liquide par effet de la pression à sortir vers le filtre de  $0,22\mu\text{m}$  lié à un support de filtration ; **Support de filtration** (Fig.13) : 142mm. ; **Verreries** (barreau aimanté, bouteilles, flacons à 250ml).
- ✓ Tous les endroits critiques du matériel (bouchon et jointures) doivent être enveloppé avec du papier aluminium et sur-envelopper avec du papier Kraft et coller en-dessous un ruban adhésive indicateur de stérilisation (Fig.13) qui indique par coloration si la stérilisation a atteint la température adéquate (Anonyme, 2013).



**Figure 13** : Conditionnement du matériel pour passer à la stérilisation à l'autoclave (Original, 2019).

#### 2-1-2-Stérilisation du matériel à l'autoclave

Avant toute stérilisation, les matériels doivent être pré-désinfectés, lavés avec l'eau distillée, et séchés. Il est indispensable de vérifier que chaque instrument est propre, sec et en bon état (absence de taches).

## Etude expérimentale

La stérilisation à la vapeur consiste 3 paramètres essentiels : Température 121°C, pression 1 Bars, à un temps de 30min (le cycle dure 2h tenant compte du temps de chauffage et de refroidissement de l'autoclave). Si l'un de ces paramètres n'est pas respecté, la stérilisation ne sera pas fiable.

### 2-2-Décongélation et mise en culture des cellules BHK-21

#### 2-2-1-Décongélation

Les cellules BHK-21 sont congelées dans des tubes cryogènes (ou cryotubes) à un volume de 1 ml et à une concentration de 10 milliards de cellules par ml. Le cryotube est retiré de son emplacement de stockage dans de l'azote liquide (Fig.14.A,B,C), puis transférer immédiatement dans un bain Marie à 37°C (Fig.14.D), en l'agitant doucement jusqu'à décongélation complète. Cette décongélation rapide (de 60 à 90 secondes) permet d'obtenir une meilleure récupération pour la plupart des cultures cellulaires ; elle réduit ou empêche la formation de cristaux de glace pouvant endommager la cellule pendant la réhydratation (John, 2014).

Après décongélation complète ; la suspension cellulaire comportant des cellules BHK-21 est mise en culture.



**Figure 14** : Processus de décongélation des cellules BHK-21 (Original, 2019).

**A.B.C** : Retirent des cryotubes de l'azote liquide.

**D** : Décongélation des cellules BHK-21 dans un bain Marie.

## 2-2-2-Mise en culture

Après avoir effectué une décongélation complète, la suspension cellulaire comportant des cellules BHK-21 est mise en culture ; en la transférant dans un flask de culture cellulaire de taille  $25\text{cm}^2$  (T<sub>25</sub>) (après Réglage du flux de la hotte (PSM de type II) et désinfection de la paillasse à l'alcool 70%), puis un volume adéquat de milieu de culture DMEM à 10% SVF (SVF 10%= 50ml SVF + 450ml DMEM) est ajouté goutte à goutte à l'aide d'une pipette stérile dans le flask T<sub>25</sub> afin de s'assurer de l'obtention d'un tapis cellulaire. A cette étape délicate de la manipulation la viabilité cellulaire est réduite de façon significative si le milieu d'entretien est rajouté rapidement.

Les cellules sont ensuite incubées dans une étuve à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C, jusqu'à la fixation des cellules au support, puis le milieu à remplacer par un milieu frais après 4 heures de mise en culture , afin d'éliminer l'excès de DMSO contenu dans le milieu utilisé auparavant dans la cryoconservation car il s'agit d'un conservateur toxique pour les cellules en culture (Fig.15) et a la fin une ré-incubation à l'étuve à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C jusqu'à trypsination et avec une observation quotidienne au microscope optique inversé.



**Figure 15** : Observation au microscope photonique inversé des cellules BHK-21 (Gr x 40) suite au renouvellement du milieu après 4h de mise en culture des cellules (**Original, 2019**).

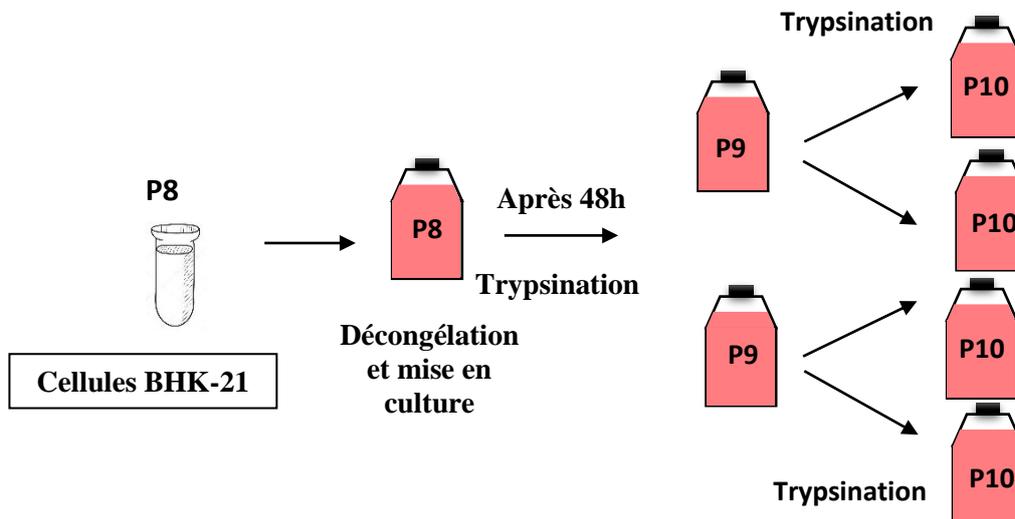
Cellules normales : Adhérente, plates et allongées qui présentant des processus cytoplasmiques étendus sur la longueur de la cellule et des noyaux plats de forme ovale.

# Etude expérimentale

## 2-3-Passage d'entretien des cultures cellulaires (Trypsination)

Cette technique qui consiste à disperser dans la trypsine des cellules BHK-21 cultivées en couche monocellulaire a été inspirée par les techniques existantes en matière de cultures de rein de mouton, de chevreau et de veau par **Plowright et Ferris (1959)** et qui a été faite elle-même par des modifications mineures de la technique de **Bodian (1956)**.

Avant de procéder à la trypsination il faut sélectionner la culture de au moins 48 heures présentent un tapis confluent à plus de 80% (voir procédé de trypsination, Annexe 5), dont le tapis cellulaire est détaché par trypsination. Les cellules sont remises en suspension puis réensemencées sur d'autres boites de culture (un flask est dévisé en deux flasks). Cette étape est répétée autant de fois que la concentration cellulaire récupérée après trypsination est élevée.



**Figure 16 :** Schéma du procédé de la trypsination sur les cellules BHK-21 (**Original, 2019**)

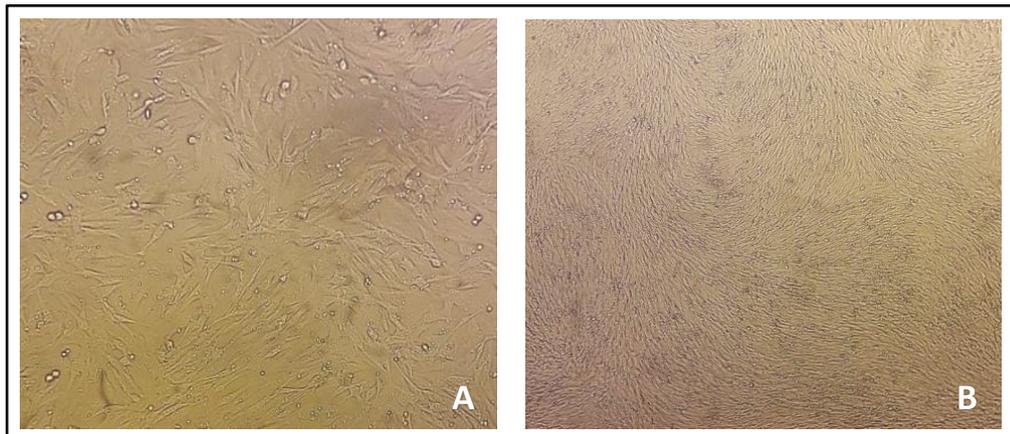
### 2-3-1-Surveillance des cultures après l'entretien

#### A-Variation du pH

La surveillance de la couleur du milieu de culture contenu dans des boites assurée par le changement de couleur du milieu de culture DMEM qui est rouge à l'origine, il devient jaunâtre à des pH acides et violacé à des pH alcalins (**Ben-Messaoud, 2013**).

## B-Observation sous microscope photonique inversé

Les observations microscopiques permanentes nous permettent de suivre le développement du tapis chaque 24h pour suivre l'état de confluence entre autres étudier la morphologie et la cinétique de prolifération cellulaire (fig.17A, B) et voir éventuellement s'il y a présence d'effets cytopathiques induits par le virus en cas d'inoculation et aussi s'il y a une contamination éventuelle. On peut distinguer les contaminations avancées à l'œil nu car dans ce cas le milieu de culture devient trouble.



**Figure 17** : Observation au microscope photonique inversé des cellules BHK-21 (Gr x 40) après trypsination (**Original, 2019**).

- A.** 24h après trypsination : cellules normales à 50% de confluence
- B.** 48h après trypsination : cellules normales à 90% de confluence

## C-Etude morphologique

La morphologie des cellules en culture est un autre paramètre conditionnant la qualité des cultures cellulaires et l'état physiologique des cellules. Pour cela il est indispensable de connaître exactement les propriétés des cellules manipulées dans leur environnement tissulaire d'origine d'où elles ont été extraites (tissu épithélial, conjonctif, sanguin...etc.).

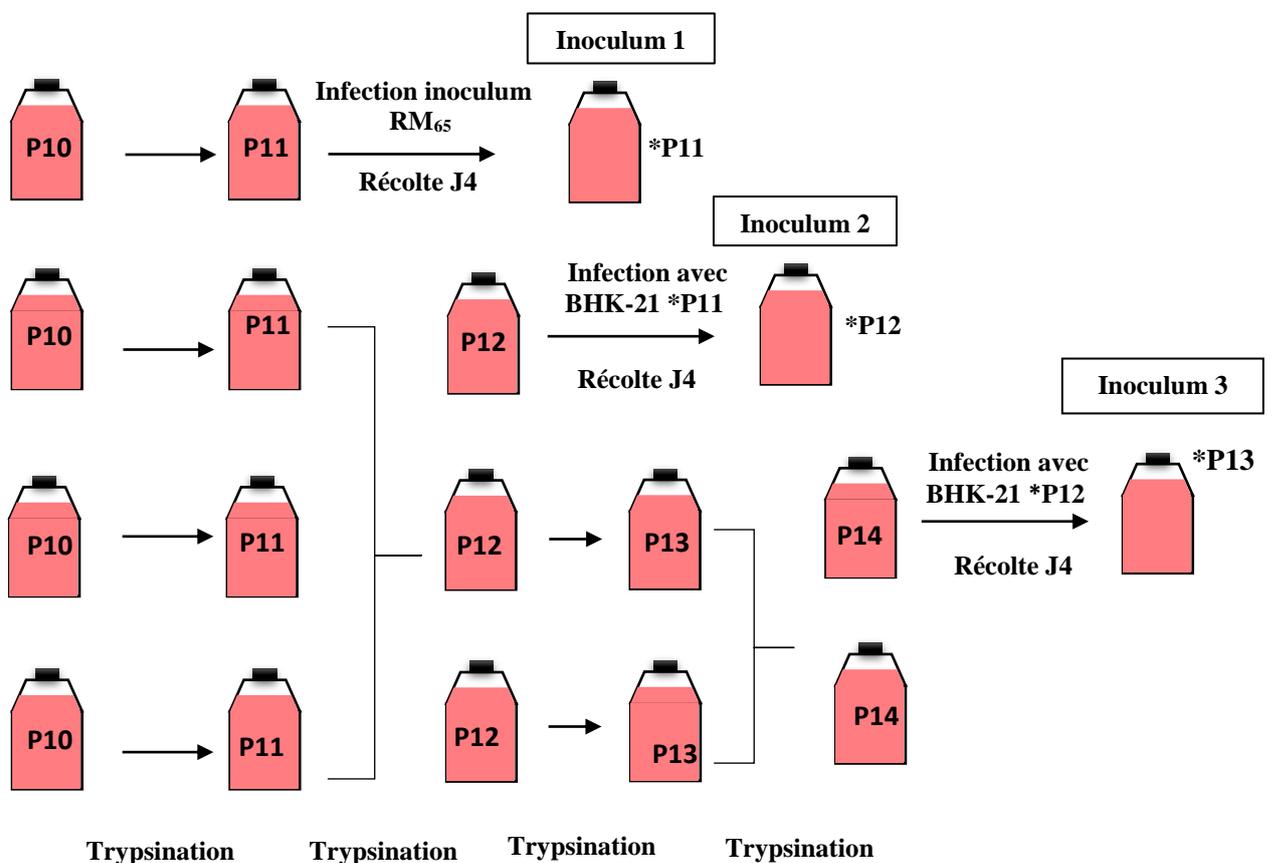
### 2-4-Passage d'infection virale (Inoculation)

En arrivant au 11<sup>ème</sup> passage d'entretien on procède au passage d'inoculation virale après 24 à 48 h de trypsination sur une culture présentant 60 à 80% de confluence. Après avoir vidé le flask T<sub>25</sub> du P<sub>11</sub> contenant les cellules BHK-21, le tapis cellulaire est inoculé avec 1ml de suspension virale de la souche RM<sub>65</sub>, suivie d'une incubation dans l'étuve à 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C pendant 1h afin de permettre l'adsorption du virus, et à la fin ajout de 10ml de milieu DMEM à 5% de SVF suivie d'une incubation de 4 jrs (jusqu'à obtention d'un ECP)

## Etude expérimentale

**Nb.** Pour chaque passage d'inoculation un prélèvement de 2ml d'inoculum obtenu après la récolte se fait suite à l'obtention d'un ECP à 80% et qui consiste en deux cycles de congélation-décongélation du flask d'origine (contenant les cellules infectées par le virus). Cet inoculum va servir pour l'infection du prochain passage. Cette opération est répétée jusqu'au dernier passage, en gardant toujours les mêmes conditions.

Pour le 1<sup>er</sup> passage d'adaptation de la souche RM<sub>65</sub> sur les cellules BHK-21, l'inoculation est faite avec 2ml de suspension virale mère obtenue sur une culture de cellules RM., pour le 2<sup>ème</sup> passage ; l'infection des cellules BHK-21 est faite avec 2ml d'inoculum récolté du 1<sup>er</sup> passage d'adaptation. Pour le 3<sup>ème</sup> passage d'adaptation ; l'infection des cellules BHK-21 est d'adaptation faite avec 2ml d'inoculum récolté du 2<sup>ème</sup> passage (Fig.18).



**Figure 18 :** Schéma explicatif du procédé de l'infection sur les cellules BHK-21 (Original, 2019).

\*congélation-décongélation (2cycles)

### 2-4-1-Surveillance et observation de l'effet cytopathique

L'effet cytopathique (ECP) est observé au fur et à mesure de son évolution à l'état frais à l'aide du microscope photonique inversé (Fassi-Fehri et al., 1983).

## Etude expérimentale

Les cellules infectées présentent un ECP léger dès 48 h après l'inoculation et qui devient total à 96-120 h (Ramyar, 1972).

### 2-4-2-Récolte des suspensions virales

Après 4 à 5 js d'incubation des flasks inoculées, la destruction des tapis cellulaire par le virus est généralement entre 60 à 80%. Les flasks vont subir 2 cycles de congélation/decongélation pour éclater les cellules et libérer tous les virions contenus dedans. Par la suite les suspensions virales récoltées sont conservées à -20°C pour les inoculations des passages ultérieurs et pour l'évaluation du titre viral.

### 2-4-3-Titrage du virus

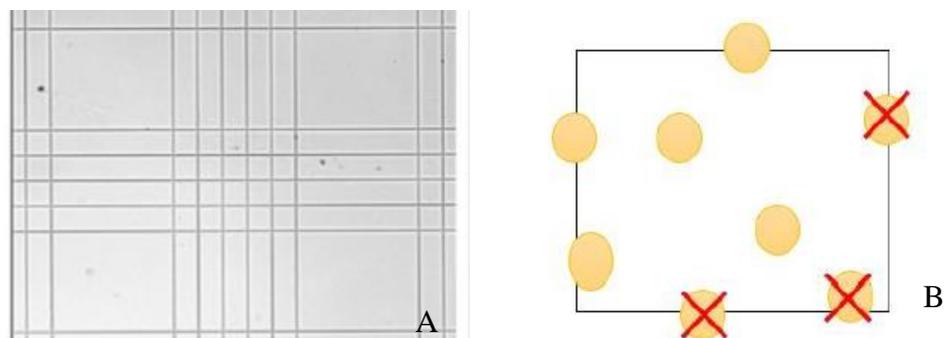
Le titrage des suspensions virales récoltées sur BHK-21 et clarifiées est effectué après chaque passage d'adaptation sur cellules RM, avec des procédures des dilutions dans le but d'évaluer leur titres finales. Cette suspension cellulaire est préparée à raison d'une concentration de  $10^5$  cellules/ml, avec un ensemencement de 100ul dans chaque puits de la microplaque P96, donc on aura  $10^4$  cellules/puits. Pour cela en utilisant la méthode de Numération à la cellule de Malassez (Fig.19) qui est nécessaire pour établir ou surveiller les taux de croissance, ainsi que d'établir de nouvelles cultures avec des nombres de cellules connus (Annexe 6) (Anonyme, 2014).

Au début Il faut compter le nombre de cellules dans 10 carreaux au niveau de la cellule de Malassez avec cinq carreaux horizontaux et cinq verticaux, ou deux lignes ou deux colonnes

On applique la formule :  $N = n \times 10^4 \text{ cellules / ml}$

**n** : Total des nombres des cellules dans chaque cas.

**N** : Nombre de cellules par 1ml de milieu.



**Figure 19** : Methode de Numération à la cellule de Malassez (Baédent, 2000 : Monod, 2014)

**A** : Quadrillage vide de cellules de malassez

**B** : Schématisation de sa lamelle et de la localisation des dépôts de suspension cellulaire colorée

# Etude expérimentale

## 2-4-4-Lecture finale du titrage

La lecture finale des microplaques du titrage se fait au 7<sup>ème</sup> js d'incubation. Le titre final est obtenu par la détermination de la dilution terminale (D.T.) qui provoque un effet cytopathique dans 50% des puits, et qui est calculée par la méthode de Spearman-Kärber (**Karkber, 1931**). Les résultats sont exprimés en dose infectieuse de 50% de la culture de tapis (DICT<sub>50</sub>/ml).

➤ **Méthode de Spearman-Kärber:**

$$\text{Log10 Dilution Terminale} : - X - d \left( \sum \frac{r_i}{n_i} - 0,5 \right)$$

- **X**: log10 de l'inverse de la plus fiable dilution celle pour la quelle tous les puits sont positives
- **d** : log10 de facteur de dilution
- **ni** : nombre de puits utilisés a chaque dilution après soustraction des puits éliminés
- **ri** : nombre des puits positifs (parmi ni)

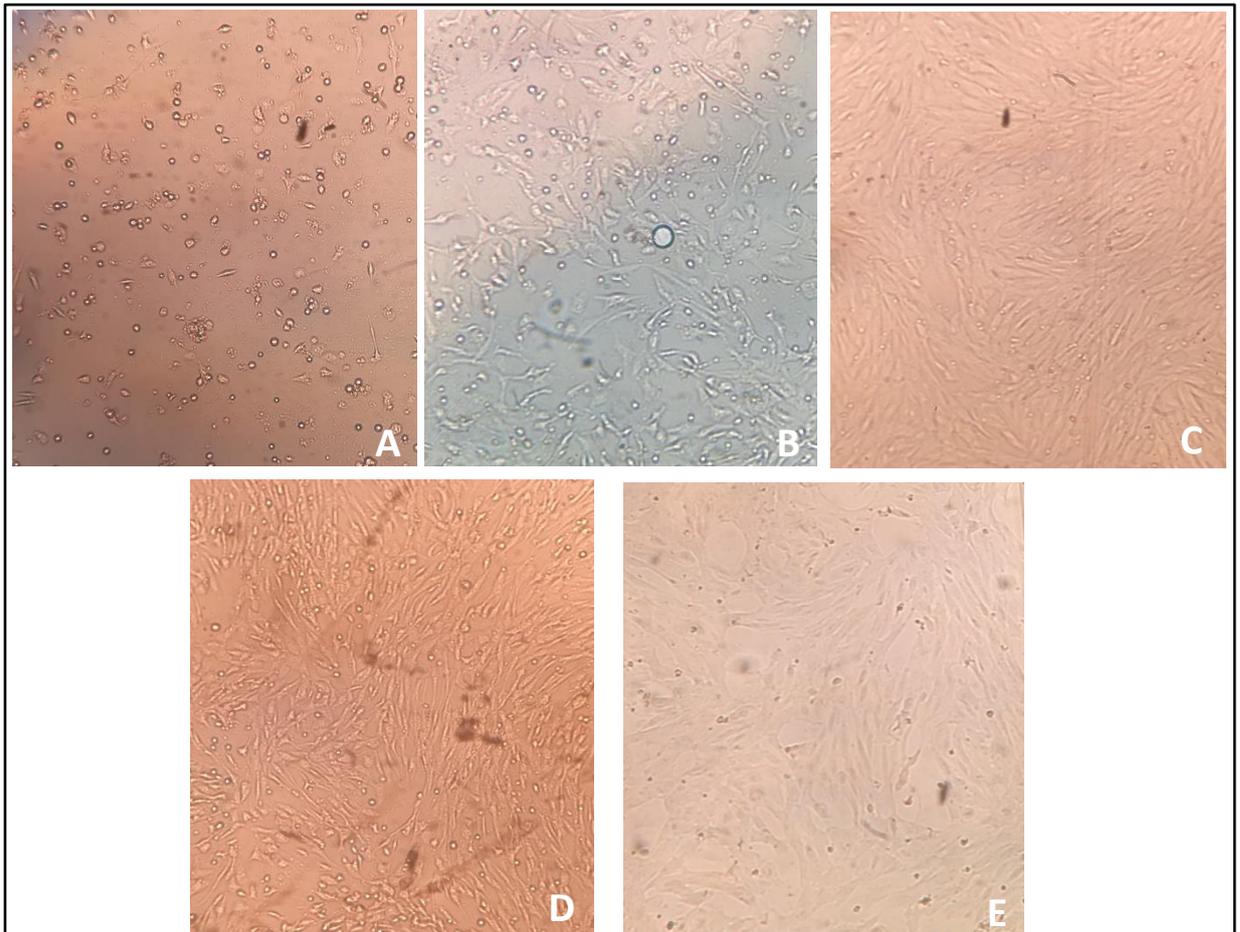
### 2-4-4-1-Exemple de calcul du titre viral

En faisant la lecture de la microplaque à 96 puits (P96) après 7 js (Fig.20) d'incubation on note ceci : Contrairement au puits négatifs (-) (Fig.21 C, E) un puits est considéré positif (+) (Fig.21 A, B, D) lorsqu'on peut révéler au moins un foyer d'ECP dedans.

	Dilutions										Cellules Témoins	
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	T-	T+
<b>A</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>B</b>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>C</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>D</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>E</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>F</b>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>G</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>H</b>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>ri/ni</b>	8/8	8/8	3/8	1/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	8/8

**Figure 20** : Exemple d'une lecture de microplaque de titrage à 7js (**Original, 2019**).

## Etude expérimentale



**Figure 21** : Lecture au microscope photonique inversé Gx10 des puits d'une microplaque de titrage à J7 (**Original, 2019**).

- A** : Tapis cellulaire de la solution mère RM-65 (témoin positif virus)
- B** : Tapis de cellules BHK-21 inoculé à ECP positif (témoin positif)
- C** : Tapis de cellules BHK-21 non inoculé à ECP négatif (témoin négatif)
- D** : Tapis de cellules BHK-21 présentant un ECP positif
- E** : Tapis de cellules BHK-21 présentant un ECP négatif

On calcule le titre viral par la méthode de Karber (**Karber, 1931**) comme suit :

$$\text{Log10 Dilution Terminale} : - X - d \left( \sum \frac{r_i}{n_i} - 0,5 \right)$$

- **X** :  $\log_{10}$  de l'inverse de la plus fiable dilution celle pour la quelle tous les puits sont postifs. Dans ce cas :  $X = \log 10^{-(-2)} = \log = \log 10^{+2} = +2$ .
- **d** :  $\log_{10}$  de facteur de dilution. Dans ce cas :  $d = \log 10 = 1$ .
- **ni** : nombre de puits utilisées a chaque dilution après soustraction des puits éliminées. Dans ce cas :  $n_i = 8$  (8 répétitions )

## Etude expérimentale

---

- **ri** : nombre des puits positifs (parmi ni).

**Donc** :  $\text{Log}_{10} \text{D.T.} = -2 - 1(12/8 - 0,5)$ .

$$\text{Log}_{10} \text{D.T.} = -3 \longrightarrow \text{D.T.} = 10^{-3}$$

**D'où on peut calculer ce titre** :  $T = 10^{-(-3)} \longrightarrow T = 10^3 \text{ DICT}_{50}/100\mu\text{l}$

$$\longrightarrow T = 10^4 \text{ DICT}_{50}/\text{ml}$$

# **Chapitre 3 : Résultats et discussion générale**

## Chapitre 3 : Résultats et discussion générale

### 1-Résultats

#### 1-1-Inoculation des BHK-21 par le *Poxvirus*

Au cours des passages d'adaptation, l'examen microscopique quotidien des boîtes de cellules BHK-21 infecté par le virus, montre des modifications remarquables sur la nappe cellulaire, ces modifications sont comme suit :

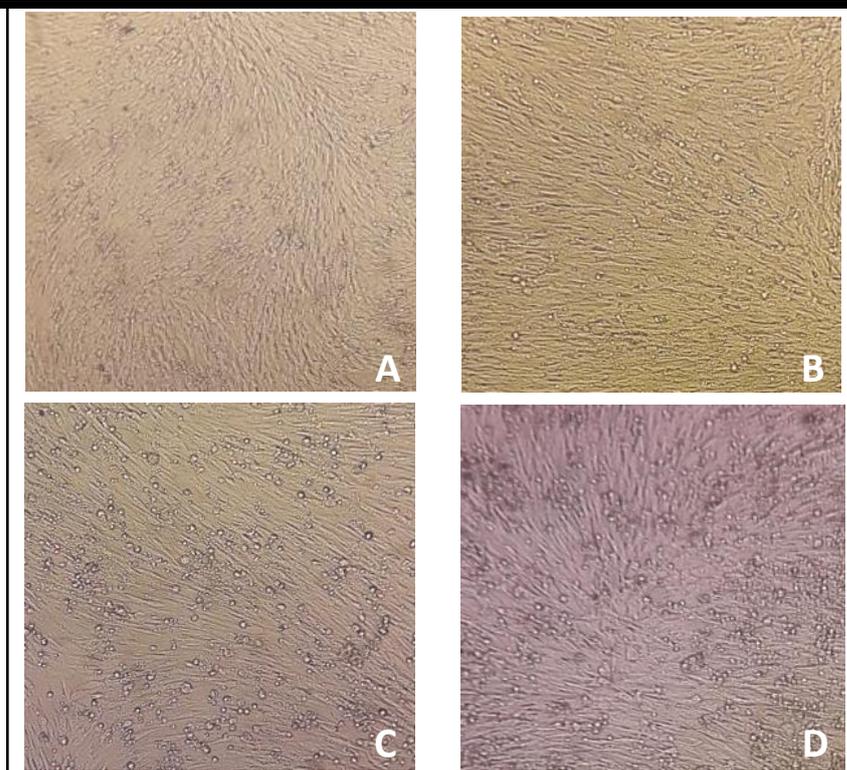
**1<sup>er</sup> jour post-infection (après 24h) :** Aucun signe d'ECP (Fig.22<sub>B</sub>) n'est observé en comparant les boîtes inoculées avec la boîte témoin négatif (non infectée) (Fig.22<sub>A</sub>).

**2<sup>ème</sup> jour post-infection (après 48h) :** On note une apparition d'ECP pour les boîtes infectées montrant un tapis confluent, sous forme de granulation et certaines cellules en suspension ayant subi une lyse cellulaire (20-30%) avec changement de leur forme qui est devenue plus ronde avec un noyau dense (Fig.22<sub>C</sub>).

**3<sup>ème</sup> jour post-infection (après 72h) :** On remarque une évolution d'apparition d'ECP qui devient généralisé sur la majorité du tapis cellulaire et qui atteint environ 70%. A ce stade, on note également plus de mort cellulaire (cellules en suspension), le cytoplasme disparaît, les cellules deviennent réduites, réfringentes et arrondies et possède un noyau ratatiné et pycnotique, il s'agit d'une altération du noyau des cellules lors de la condensation de la chromatine et diminution de sa taille à cause d'une réduction cellulaire par l'effet de la multiplication intra-cytoplasmique du virus (Fig.22<sub>D</sub>).

**4<sup>ème</sup> jours jour post-infection (après 96h) :** 80% du tapis cellulaire est détruit par l'ECP provoqué par le *Capripoxvirus*. Par ailleurs, presque la totalité du tapis cellulaire est détachée. A ce stade l'inoculum est soumis à 2 cycles congélation/décongélation pour éclater les cellules par un choc thermique provoqué afin de libérer les particules virales contenues à l'intérieur des cellules. Ensuite, le milieu de cette boîte va être conservé à -70°C pour servir d'inoculum pour le prochain passage d'adaptation. Cette étape est réalisée de la même façon (4<sup>ème</sup> jour post-infection) pour les 3 passages d'adaptation.

## Résultats et discussion général



**Figure 22 :** Lecture d'apparition d'effet cytopathogène (ECP) du *Poxvirus* sur des boîtes de cellules BHK-21 inoculées au microscope optique inversé (Gr x 40) (**Original, 2019**).

- A. Tapis de cellules BHK-21 non inoculée (témoin négatif)
- B. Tapis de cellules BHK-21 inoculée au 1<sup>er</sup> j de post-infection
- C. Tapis de cellules BHK-21 inoculée au 2<sup>ème</sup> js de post-infection
- D. Tapis de cellules BHK-21 inoculée au 3<sup>ème</sup> js de post-infection

### 1-2-Etude de la cinétique du titre viral au cours des passages successifs d'adaptation

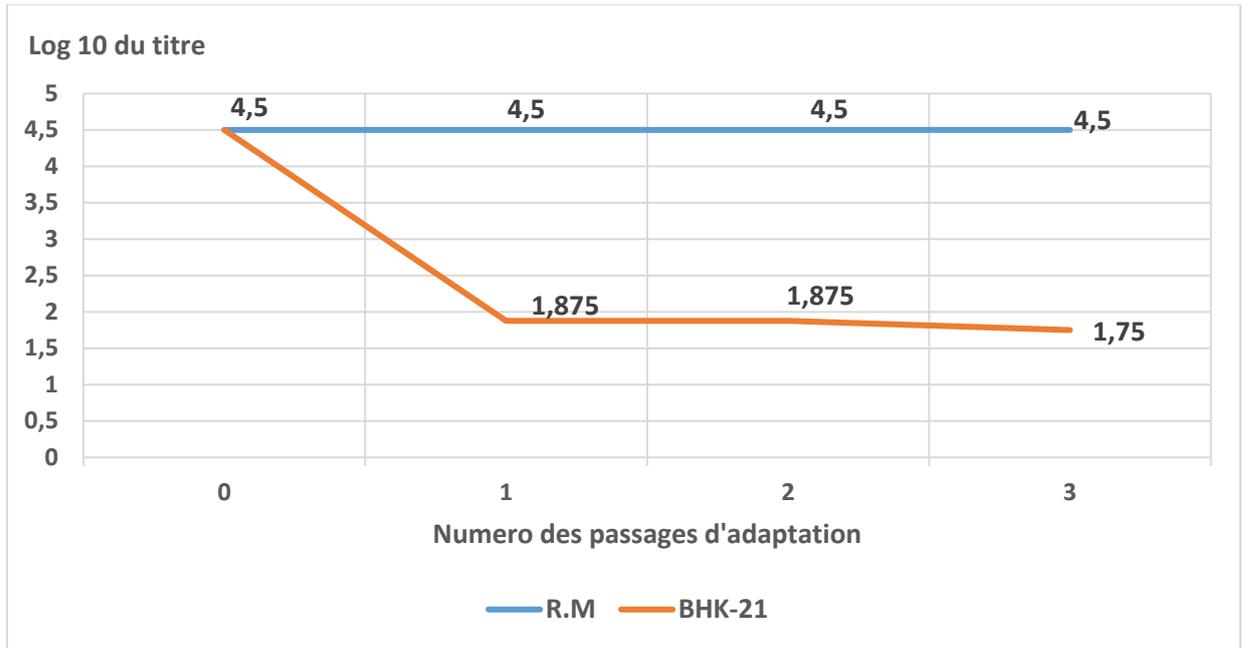
#### 1-2-3-Titrage de la suspension virale récoltée

Après le calcul des titres viraux des suspensions virales (suspension mère et suspension BHK-21) (Tableau 7), On obtient le cinétique de rendement viral pour tous les passages d'adaptation (Fig.23).

**Tableau 7 :** Résultats de titrage des suspensions virales récoltées au cours des passages d'adaptation (**Original, 2019**).

Passages	Titrage des BHK-21	Suspension mère (R.M)
Titre initiale	$10^{4,5}$ DICT <sub>50</sub> /ml	$10^{4,5}$ DICT <sub>50</sub> /ml
Titre du 1 <sup>er</sup> passage	$10^{1,875}$ DICT <sub>50</sub> /ml	
Titre du 2 <sup>ème</sup> passage	$10^{1,875}$ DICT <sub>50</sub> /ml	
Titre du 3 <sup>ème</sup> passage	$10^{1,75}$ DICT <sub>50</sub> /ml	

## Résultats et discussion général



**Figure 23** : Cinétique du rendement viral au cours des passages d'adaptation (Original, 2019).

### 2-Discussion générale :

En comparant l'apparition d'ECP sur cellules BHK-21 avec celle sur cellules R.M et tout en gardant les mêmes conditions d'adaptation, la destruction du tapis cellulaire atteint environ 80% au 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour d'inoculation sur cellules RM (**Remisse, 1978 ; Fassi-Fehri et al., 1983**) de même les résultats sont identiques concernant les cellules BHK-21 à partir du 1<sup>er</sup> passage d'après cette étude d'adaptation. Donc en se basant sur ceci on peut dire que le support cellulaire étudié (BHK-21) est permissif au *Poxvirus* dès le 1<sup>er</sup> passage.

La suspension virale (suspension mère) utilisée au cours du 1<sup>er</sup> passage d'adaptation titre à  $10^{4.5}$  DICT<sub>50</sub>/ml sur cellules R.M., tant dis que les suspensions récoltées lors du 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> passage d'adaptation sur BHK-21 ont donné respectivement des titres de  $10^{1.875}$  DICT<sub>50</sub>/ml,  $10^{1.875}$  DICT<sub>50</sub>/ml,  $10^{1.75}$  DICT<sub>50</sub>/ml (Fig.23). Cet écart remarquable entre le titre viral de la suspension mère récoltée sur cellules RM et les titres d'inocula obtenus lors des passages d'adaptation (du 1<sup>er</sup> au 3<sup>ème</sup>) du *Capripoxvirus* sur cette lignée cellulaire BHK-21 peut être expliqué par une faible sensibilité des cellules vis-à-vis à la suspension virale utilisée (RM<sub>65</sub>) qui est probablement due au fait que les cellules BHK-21 ne sont pas assez permissives et ne permettant donc pas une intégration efficace des particules virales à l'intérieur des cellules. En effet, ce support cellulaire n'a jamais été utilisé auparavant dans des études similaires d'adaptation.

Sachant que les titres viraux obtenus régulièrement sur les différentes suspensions préparées sur cellules RM lors de la production du vaccin anti-claveleux sont entre  $10^5$  DICT<sub>50</sub>/ml et  $10^8$  DICT<sub>50</sub>/ml (**El-Awar et El-Zein, 1986**) et en comparaison avec d'autres études établies pour cette même problématique étudiée au sein du laboratoire de production des vaccins viraux vétérinaires, IPA mais sur d'autres supports cellulaires tels que la lignée Vero (**Belmessabih et Hamidouche, 2015**) et BSR (**Ferhani, 2019**).

Ces résultats sont préjugés insatisfaisants ce qui est probablement dû à plusieurs causes. D'une part, l'insuffisance de la période d'adsorption lors de l'infection qui peut être étalée sur plus d'une heure, d'autre part, le ratio entre la concentration des cellules à infecter et le volume d'inoculum utilisé n'a pas été défini (un titrage d'inoculum au préalable est jugé nécessaire afin de définir ce ratio), ainsi que la richesse cellulaire est insuffisante par rapport à la concentration de l'inoculum (mauvais entretien des cellules qui réside notamment en l'utilisation d'un milieu de culture non adapté pour ce support cellulaire « BHK-21 » : la Tryptose-phosphate devrait être additionnée au DMEM car elle est nécessaire pour la croissance de ces cellules).

## Résultats et discussion général

---

Enfin, on peut dire que plus de passages d'adaptation sont nécessaires afin d'obtenir une meilleure permissivité des BHK-21 vis-à-vis au *Capripoxvirus* et par conséquent un meilleur rendement viral.

# **Conclusion générale et perspectives**

### Conclusion générale et perspectives

Cette étude nous a permis de tester la sensibilité des cellules BHK-21 vis-à-vis de la souche RM<sub>65</sub>. Les résultats de cette étude effectuée en 3 passages d'adaptations sont préjugés insatisfaisants, ce qui est probablement dû aux l'insuffisance de la période d'adsorption, l'indétermination du ratio entre la concentration des cellules à infecter et le volume d'inoculum ainsi que l'addition du Tryptose-phosphate.

On peut dire aussi que la diminution observée du rendement viral avec l'avancement des passages d'adaptations ne veut pas dire qu'au prochains passage le rendement vas forcément continuer à diminuer, bien au contraire ; plus on effectue des passages successifs plus les cellules BHK-21 vont s'adapter et devenir plus permissives et plus sensibles au *Capripoxvirus*, et par conséquent on obtient un meilleur rendement viral.

En perspective, le passage à l'échelle de production fait appel à la prise en compte des résultats obtenus lors de cette étude d'adaptation préliminaire afin de bien établir les paramètres à respecter lors des prochains passages d'adaptation nécessaires pour pouvoir enfin juger la possibilité ou non d'utiliser la lignée cellulaire BHK-21 comme un support alternatif des cellules primaires RM pour produire le vaccin anti-claveleux, et ce en agissant sur les différents points critiques cités en discussion et de continuer ce travail d'adaptation pour avoir plus de passages afin de rendre cette recherche plus pertinente à l'avenir

Dans ce contexte, si cette étude peut nous garantir au future la possibilité de faire passer la production du vaccin anticlaveleux sur les cellules BHK-21, les avantages seront essentiellement économiques (la réduction du cout et de la duré de la production) et éthique (en évitant l'utilisation des foetus d'où provient les cellules R.M.)

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

**Achour H.A., Bonguedour R., Bouhbal A., Guechtouli A. and Aouissat M., (2000)** - *Comparative study of immunizing ability of some attenuated strains of sheep Poxvirus and sensitizing vaccine*. Rev. Sci Tech., 19(3): 773-783.

**Adolphe M., (1988)** - *Base des méthodes de culture*. In : Culture de Cellules Animales : Méthodologies-Applications. Ed. Inserm, Paris, 1-8 pp.

**Ajian N., Guerin N., Denis F. and Rey M., (2009)** - *La vaccination*. In : Manuel pratique de tous les vaccins, Ed. Elsevier Masson, Paris, 784 p.

**Anonyme (2004) : International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) – Poxviridea**. In : Report; Taxonomy Chapter Version: ICTV, 9<sup>th</sup>. [en ligne] Disponible sur : [«https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna\\_viruses/74/poxviridae»](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/74/poxviridae) (Consulté le 20 avril 2019).

**Anonyme (2008) : Comité Technique Des Vaccinations (CTV) - Guide des vaccinations**, direction générale de la santé Ed. INPES., Paris : Direction générale de la santé, Saint-Denis ; France ,446p. [en ligne] Disponible sur : [«https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Guide\\_des\\_vaccinations\\_-\\_Edition\\_2008.pdf»](https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Guide_des_vaccinations_-_Edition_2008.pdf) (Consulté le 1 Avril 2019).

**Anonyme (2011) : Direction de Service Vétérinaire (DSV)- Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural**, Plan national de communication en santé animale, Alger.

**Anonyme, (2012): Office International des Epizooties (OIE) - Sheep and goat pox**, In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chap.2-7-13, Paris, 1-5 pp. [en ligne] Disponible sur : [« http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/ »](http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/).

**Anonyme, (2013) : Institut Pasteur d’Algerie (IPA) - Dossier technique Clavax**, du laboratoire de production et de développement des vaccins viraux vétérinaires, unité de production de vaccins anticlaveleux, annexe Kouba, Alger.

**Anonyme, (2014) : American Type Culture Collection (ATCC) - Animal cell culture guide: tips and techniques for continuous cell lines CCL-10**, Ed. Hay R., University Blvd. Manassas, 36

## Références bibliographiques

---

p. [en ligne] Disponible sur :

«[https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture\\_Guide.ashx](https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.ashx)»

(Consulté le 2 Mai 2019).

**Anonyme, (2015) : Organisation mondiale de la santé animale (OIE) - Disease Timelines fiche technique : Sheep and goat pox.** Paris, 1-5 pp. [en ligne] Disponible sur : «[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home.](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home.) » (Consulté le 5 Mai 2019).

**Anonyme, (2016) : Biosera - Fiche technique produit : Sérum de veau fœtal (Amérique du sud), testé sur cellules souches,** France, 4 p. [en ligne] Disponible Sur : «<http://www.biosera.com/wp-content/uploads/2014/09/TDS-FB1001S.pdf>» (Consulté le 5 Mai 2019).

**Anonyme, (2018) : Organisation mondiale de la santé animale (OIE) - Contrôle de la stérilité et de l'absence de contamination des matériels biologiques à usage vétérinaire,** Chap. 1.1.9. Paris, 5-9 pp. [en ligne] Disponible sur : «[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_sheep\\_pox\\_goat\\_pox.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_sheep_pox_goat_pox.pdf)» (Consulté le 10 Mai 2019).

**Anonyme, (2019) : American Type Culture Collection ATCC - Catalogue of Cell Lines & Hybridomas: BHK21 [C13] (ATCC® CCL10™),** Ed. Hay R., USA. [en ligne] Disponible sur «[http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-10.aspx?geo\\_country=dz#generalinformation](http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-10.aspx?geo_country=dz#generalinformation)» (Consulté le 5 juin 2019).

**Aparna M., Venkatesan G. and Amit K., (2016) - Capripoxviruses of small ruminants: Current updates and future perspectives.** Asian J. Anim. Vet. Adv., 11(12): 757-770.

**Assayma Y., and Yao T., (2017) - Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues.** Reprod. Med. Biol., 16(2): 99-111

**Babiuk S., Bowden T.R., Boyle D.B., Wallace D.B. and Kitching R.P., (2008) - Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle.** Transb. Emerg. Dis., 55(7): 263-27

## Références bibliographiques

---

**Balls M., Goldberg A.M., Fentem J.H., Broadhead C. L., Burch R. L., Festing M. F. and Van-Zutphen B.F., (1995)** - *The three Rs: the way forward, the report and recommendations of ECVAM Workshop 11*, *Alter. Labora. Anim.*, 23(6): 838.

**Barret P.N., Mundt W., Kistner O. and Howard M.K., (2009)** - *Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines*, *Expert. Rev. Vacc.*, 8(5): 607-18.

**Barlovatz-Meimon G. and Xavier R., (2014)** - *Culture de cellule animal 3<sup>ème</sup> Éd.* Ed. Lavoisier, 667 p.

**Beard P.M., Sugar S., Bazarragchaa E., Gerelmaa U., Tserendorj S., Tuppurainen E. and Sodnomdarjaa R., (2010)** - *A description of two outbreaks of Capripoxvirus disease in Mongolia*. *Vet. Microb.*, 142(3-4): 427–431.

**Belmessabih N. and Hamidouche M., (2015)** – *Adaptation du Poxvirus (la souche vaccinale RM65) sur la lignée cellulaire VERO*, *Mém., Master, Biologie et population des organismes*, Univ. Mohamed Bouguerra, Boumerdes, 62 p.

**Ben-Messaoud G., (2013)** - *Validation de procédé de production d'antigène viral sur culture cellulaire BHK2*, *Lic., Biotech. Médic., Univ., El Manar, Tunisie*, 44 p.

**Bertrand J-J., Saliou P. and Seytre B., (2006)** - *Les sentinelles de la vie : le monde des vaccins*, Ed. Albin M., Paris, 219 p.

**Bhanuprakash V., Indrani B.K., Hosamani M. and Singh R.K., (2006)** - *The current status of sheep pox disease*, *Comp. Immun. Microb. Infect. Dis.*, 29(1): 27-60.

**Bhanuprakash V., Hosamani M. and Singh R.K., (2011)** - *Prospects of control and eradication of Capripox from the Indian subcontinent: A perspective*, *Antivir. Res.*, 91(3): 225-232.

**Cézard F., (2013 a)** - *Biotechnologies en 27 fiches*, Ed. DUNOD, Paris, 160 p.

**Cézard F., (2013 b)** - *Entretien des lignées cellulaires*, in *Biotechnologie en 27 fiches*, Ed. 2 .DUNOD, Paris, 5-11 pp.

## Références bibliographiques

---

**Costa U.M., Reischak D., da Silva J. and Ravazzolo A.P., (2005)** - *Establishment and partial characterization of an ovine synovial membrane cell line obtained by transformation with Simian Virus 40 T antigen*, Virol. Meth., 128 (1-2): 72-8.

**Day M.J. and Schultz R.D., (2011)** - *Veterinary immunology : principles and practice*, Ed. Manson, London, 256 p.

**Dimock C. and Edwards., (2007)** - *Infection of Newborn Syrian Hamsters With the Virus of Mare Abortion (Dimock and Edwards)*, Am. J. Pathol., 18(4): 555-61.

**Duigo A., (2005)** - *Maitrise des procédés de culture cellulaire pour la production de vaccins*, Th. Doc. Faculté de pharmacie, Université Hanri Polncare, Nancy I., 145 p.

**Durrani A., Mirza A., Khan Z., Khan N., Kulkarni A. and Ali Y., (2015)** - *Adaptation of mammalian cell from 10% serum medium to serum free or low serum media*, Int. J. Appl. Res., 1(9): 770-772.

**El-Awar F. and el-Zein A., (1986)** - *Characterization of a sheep attenuated in cell culture*. Zentralbl. Veterinar. B., 33(8): 601-8.

**Fassi-Fehri., El Harrak M. and Bertin F., (1983)** - *Etude compare du developpement de deux souches vaccinales du virus claveloux sur cellules testiculaires et rénales d'agneau : Resultas préliminaires*, Rev. Sci. Tech. Int. Epiz., 2(2): 499-507.

**Fassi-Fehri M., (1988)** - *La clavelée, les maladies infectieuses du mouton. Tome 2*, Ed. Actes, Rabat, 5-27 pp.

**Fassi-Fehri M. and Lefevre P.C., (2003)** - *Clavelée et variole caprine*. In : Collectif, Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes. Ed. TEC & DOC, 415-427 pp.

**Faure S., (2013)** - *Vaccins (1/2)*, Actual. Pharmac., 52(527): 57-60 .

## Références bibliographiques

---

**Ferhani S., (2019)** – *L'adaptation du Poxvirus (la souche vaccinale RM65) sur la lignée cellulaire BSR*, Mém, Mag., Scien. Vet., ENSV, Algérie, 60 p.

**Freshney R.I., (1998)** - *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 2<sup>nd</sup> Ed Ed. Alan R.Liss, New York., 45: 330.

**Gershon, P. D. and Black D. N., (1989)** - *A Capripoxvirus pseudogene whose only intact homologs are in other poxvirus genomes*, Virology, 172(1):350-4.

**Goffard A., (2011)** - *Culture cellulaire et virologie. Intérêts et applications de la culture cellulaire en virologie*, EMC. Bio. Médic., 6(2) :1.

**Haller S., Peng C., Mefadden G. and Rothnburg S., (2013)** – *Poxviruses and the evolution of host rang and virulence*. Infect. Genet. Evol., 21:15-40.

**Harrison K., Sherrin D., Hawthorne T., Breen T, West G. and Wilson L., (1990)** - *Embryotoxicity of micropore Filters used in liquid sterilization*, In-Vitro. Fert. Embryo. Transf., 7(6): 347-350.

**Heine H.G., Stevens M.P., Foord A.J. and Boyle D.B., (1999)** - *A Capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene*, J. Immunol. Meth., 227(1-2): 187-196.

**Hernandez R. and Brown DT., (2010)** - *Growth and maintenance of baby hamster kidney (BHK) cells*. Curr. Protoc. Microbiol., 17(1): 17-25.

**Hunter A., Uilenberg G. and Meyer C., (2006)** - *La santé animale, 2. Principales maladies*. Ed. Quae, CTA, Karthala, 86-88 pp.

**Hutyra F., Marek J. and Manninger R., (1946)** - *Special Pathology and Therapeutics of the Diseases of Domestic Animals*. Bailliere, Ed. Tindall and Cox, London, UK., 353-366 pp.

**Joubert J-J., (2019)** – *Clavelée*, Encyclopædia Universalis [en ligne]. Disponible sur : « <http://www.universalis.fr/encyclopedie/clavelee/> » (Consulté le 05 avril 2019).

## Références bibliographiques

---

**John R., (2014)** - *Guide général de cryoconservation de cultures de cellules animales* : Bulletin technique, Ed. Corning Incorporated : Life Sciences, USA, 1-9 pp.

**Kali K., (2014)** - *Etude comparative de la cénétique des anticoprs anticlaveleux post vaccinaux. Evalués par séro-neutralisation sur cultures cellulaires primaires R.M et de lignée continue VERO*, Mém, Mag., Scien. Vet., ENSV, Algérie, 81 p.

**Kara P.D., Afonso C.L., Wallace D.B., Kutish G.F. and Abolnik C., Vreede F.T., Taljaard L.C., Zsak A., Viljoen G.J. and Rock D.L., (2003)** - *Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of Lumpy skin disease virus*. Arch.Virol, 148(7): 1335-1356.

**Karber G., (1931)** - *Beitrag zur kollektiven behandling pharmakologischer reihenverche*, Arch. Fur. Experimntel. Patholo, 162(1): 480-483 pp.

**Kitching R.P., (1983)** - *Progress towards sheep and goat pox vaccines*, Vaccine, 1(1): 4-9.

**Knipe D., Holwley P., Lamb R., Martin M., Roizman B. and Staus S., (2011)** – *Fundamental virology (fourth Ed.)*, Ed. LWW, Philadelphia (USA), 1395 p.

**Kretzmer G., (2002)** - *Industrial processes with animal cells*, Appl. Microbio. Biotech., 59(2-4): 135-142.

**Kretzmer G. and Klein K., (2002)** - *The Concept of human dignity in human rights discourse* ,Ed. Kluwer Law International, London, 314 p.

**Lamien C., Lelenta M., Goger W., Silber R., Tuppurainen E., Matijevic M., Lucjins A. and Diallo A., (2001)** - *Real time PCR method for simultaneous detection, Quantitation and differentiation of Capripoxviruses*, J.Virol. Meth., 171(1): 134-140.

**Langdon S.P., (2004)** - *Basic Principles of Cancer Cell Culture*, In: *Methods in Molecular Medecine*, Cancer Cell Culture: Meth and Protocols. Ed. Humana Press, Inc, Totowa, 33-42 pp.

## Références bibliographiques

---

**Lodish H., Berk A. and Mastudaira P., (2005)** - *Biologie moléculaire de la cellule*. 5<sup>th</sup> Ed. W.H freeman and co., N.Y., 236-237 pp.

**Macleod K.G. and Langdon S.P., (2004)** - *Essential Techniques of Cancer Cell Culture*. In: Ed. Meth in Molecular Medicine, Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Ed. Human Press Inc, Totowa, 17- 29 pp.

**Macpherson I. and Stoker M., (1962)** - *Polyoma transformation of hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence*, J. Virology, 16(2): 147-151.

**Magniez F., (2008)** - *La culture cellulaire*, biotechnologie. The biotechnological site for the future Classical - Hébergé par Overblog [en ligne]. Disponible sur [«http://www.technobio.fr/article-16526675.html»](http://www.technobio.fr/article-16526675.html)

**Malik Y.S., Singh D., Chandrashekar K.M., Shukla S., Sharma K., Vaid N. and Chakravarti S., (2011)** - *Occurrence of dual infection of Peste-des-petits-ruminants and goatpox in indigenous goats of Central India*. Transbound. Emerg. Dis., 58(3): 268-273.

**Mammette A., (2002)** - *Virologie médicale*. Ed. Presse universitaire, Lyon, 798 p.

**Mattos D.A., Silva M.V., Gaspar L.P. and Castilho L.R., (2015)** - *Increasing Vero viable cell densities for yellow fever virus production in stirred bioreactors using serum-free medium*. Vaccine, 33(35): 10-16.

**Massip P., (2002)** - *Vaccinations : Bases immunologiques, indications, efficacité, complications*, 14 p. [en ligne]. Disponible sur : « <http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/MODULE7/item85/pdf/Vaccinations.pdf?fbclid=IwAR1AKyZyyj5nFuYVc8t6MOxNnCjk2ellmcyffmFn8JgxQyt210Aftt8vHIc> » Consulté le (le 11 juin 2019).

**Michael J., Day M.J., Ronald D., Schultz., (2011)** - *Vaccination*. In : *Veterinary immunology* .Ed. principles and practice. London, Manson, 192-197p.

## Références bibliographiques

---

**Mirakabadi A.Z. and Moradhaseli S., (2013)** - *Comparative Cytotoxic Evaluation of Frer and Sodium Alginate Nanoparticle-Encapsulated ICD-85 on Primary Lamb Kidney Cells*. Iran J. Cancer Prev, 6(3): 151-159

**Monod J., (2014)** - *Établissement Et Exploitation D'une Lignée Cellulaire De Gliome Canin Pour La Recherche Thérapeutique*, Mém., Doc., Médecine - Pharmacie, Univ. Claude-Bernard , Lyon I, 195 p.

**Moss B., (1991)** - *Vaccinia virus, A tool for research and vaccine development*. Sci., 252(5013): 1662-1667.

**Moss B., (1992)** – *Molecular biology of Poxvirus*, In: *Recombinant Poxviruses*, Ed. Boca Raton, CRC Press, Florida, 45-80 pp.

**Moss B. and Shisler J.L., (2001)** - *Immunology 101 at poxvirus U: Immune evasion genes*. Semin. Immunol., 13(1): 59-66.

**Moss B., (1996)** - *Poxviridae: the viruses and their replication*. Ed. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Fields virology, New York, 2637-2671 pp.

**Moss B., (2001)** - *Poxviridae: the viruses and their replication*. In *Fields Virology*. Ed. D. M. K. a. P. M. Howley. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers.cv, 2849-2883 pp.

**Muller-Eberhard H., (1988)** - *Molecular organization and function of the complement system*, Ann. Rev. Biochem., 57 (91): 321-347.

**Murphy F. A., Gibbs E.P., Horsinek M.C. and Studdert M.J., (1999)** - *Veterinary virology*, Ed. San Diego: Aca. Press, California, 629 p.

**Pastoret P.P., (2001)** - *Les mécanismes d'action des vaccins*, In : *Comptes rendus des Journées nationales GTV*. Ed. Clermont Ferrand, Paris: SNGTV, 41-42 pp.

## Références bibliographiques

---

**Perrin P., Madhusudana S., Gontier-Jallet C., Petres., Tordo N. and Merten O.W., (1995) -** *An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 suspension cell culture process: use of serum-free medium and perfusion system*, Vaccine, 13(13): 1244-1250.

**Pilly E., Yazdanpanah Y. and Pialoux G., (2009) -** *Maladie infectieuses et tropicales*. Ed. Vivactis Plus, Paris, 580 p. **Rafyi A. and Ramyar H., (1959) -** *Goat pox in Iran: Serial passage in goats and the developing egg and relationship with sheep pox*, J. Comp. Pathol. Therapeut., 69: 141-147.

**Prescott-lansing M., Harley J., and Klein D., (2013) –** *Microbiologie .2<sup>ème</sup> Ed.*, Française Ed de Boeck, Bruxelles, 1137 p.

**Ramyar H., (1972) -** *Immunisation anticla veleuse methode actuelle de production du vaccin claveleux a l'institut d'etat des serums et vaccins razi*, Iran Arch. Inst. Razi., 24 (57): 37-48.

**Salem A., Franc M., Jacquie T., Bouhsira E. and Liénard E., (2012) -** *Feeding and breeding aspects of Stomoxys calcitrans (Diptera: Muscidae) under laboratory conditions*, Parasite, 19(4): 309-317.

**Scoles G.A., Miller J.A. and Foil L.D., (2008) -** *Comparison of the Efficiency of Biological Transmission of Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by Dermacentor andersoni Stiles (Acari: Ixodidae) with Mechanical Transmission by the Horse Fly, Tabanus fuscicostatus Hine (Diptera: Muscidae)*. J.med Entomolo., 45(1): 109-14.

**Scott D.W., (2007) -** *Color Atlas of Farm Animal Dermatology*, Th. Doc., Medicine of Clinical Sci and Biomedical Sci, Univ. Ithacca, N.Y, 264 p.

**Sherman D.M., Smith M.C., (2009) -** *Goat Medicine*, Ed<sup>2ème</sup> .Wiley-Blackwell, USA, 888 p.

## Références bibliographiques

---

**Skinner M.A., Buller R.M., Damon I.K., Lefkowitz E.J., McFadden G., McInnes C.J., Mercer A.A., Moyer R.W., and Upton C., (2019)** : International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) - *Family Poxviridae; Subfamily: Chordopoxvirinae; Genus Capripoxvirus. Virus taxonomy.* [en ligne] Disponible sur : «[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna\\_viruses/74/poxviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/74/poxviridae)» (Consulté le 20 avril 2019)

**Thiry E., (2007)** - *Virologie clinique des ruminants*, 2<sup>ème</sup>. Ed. du Point Vétérinaire, Lille, 301 p.

**Thouvenot D., Billaud G. and Morfin F., (2004)** - *Actualité de la culture cellulaire et son application au diagnostic des infections virales*, *Srv. Virol., France*, 8(4): 297-309

**Touzani L., (2012)** - *Les affections cutanées chez le mouton en France métropolitaine*, Mém., Doc., Vétérinaire, Univ. CRÉTEIL, ALFORT, 242 p. [En ligne] Disponible sur : « <http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=1433> » (Consulté le 6 juin 2019).

**Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Kutish G.F. and Rock D.L., (2001)** - *Genome of lumpy skin disease virus*. *J. Virol.*, 75 (15): 7122-7130.

**Tulman E.R., Afonso C.L., Lu Z., Zsak L., Sur JH, Sandybaev N.T., Kerembekova U.Z., Zaitsev V.L., Kutish G.F. and Rock D.L., (2002)** - *The genomes of Sheeppox and Goatpox viruses*, *J. Virol.*, 76(12): 6054-6061.

**Venkatesan G., Balamurugan V and Bhanuprakash V., (2014)** - *Multiplex PCR for simultaneous detection and differentiation of sheeppox, goatpox and orf viruses from clinical samples of sheep and goats*. *J. Virol. Meth*, 195: 1-8.

**Vester D., Rapp E., Kluge S., Genzel Y., Reichl U., and Proteomics J., (2010)** - *Virus-Wirtszell-Interaktion bei der Produktion von Influenza A Impfstoff in tierischer Zellkultur, Änderungen des Proteoms von Produktionszelllinien*, *Korean J Chem. Eng*, 82(9): 1042-1656.

**Vilagines, P., and Vilagines, R., (1985)** - *Les poxviridés: caractères généraux*. In *Virologie médicale*. Ed .J. Maurin, Flammarion Médecine Sciences. Paris, 310-319 pp.

## Références bibliographiques

---

**Zeng X., Chi X., Li W., Hao W., Li M., Huang X., Huang Y., L-Rock D., Luo S. and Shihua W., (2014)** - *Complete genome sequence analysis of goatpox virus isolated from China shows high variation*, Vet. Microbiol, 173(1-2): 38-49.

**Zro K., Zakhm F., Melloul M., El-Fahime E. and Ennaji M-M., (2014)** - *A sheeppox outbreak in Morocco: Isolation and identification of virus responsible for the new clinical form of disease*, BMC Vet. Res., 10(31): 1746-6148.

Sites web utilisés :

( <http://www.cfsph.iastate.edu/>, 2014-2019)

( <http://www.isb-sib.ch>, 2009)

# **Annexes**

## Annexes

---

➤ **NB.** Ces annexes sont issues du **Dossier technique interne (2013) de L'IPA** (Annexe Kouba) 'Clavax', du laboratoire de production et de développement des vaccins viraux vétérinaires, unité de production de vaccins anticlaveleux.

### **Annexe 1. Protocole de cryoconservation des cellules**

#### **Mode opératoire de la congélation :**

1. Trypsiner les cellules (la trypsine doit être diluée dans du P.B.S (Phosphate Buffered Saline) EDTA à 0.25%).
2. Faire un dénombrement de la suspension cellulaire obtenue à la lame de Mallassez.
3. Déterminer la concentration des cellules par dénombrement.
4. Préparer une suspension cellulaire à raison de  $[C] = 2.10^6$  cellules \ ml dans du DMEM à 20% de S.V.F (Sérum de Veau Fœtal).
5. Mettre 0.9 ml de suspension cellulaire dans un tube à congélation.
6. Mettre le tube dans la glace et rajouter 0.1 ml de DMSO (Diméthyl-Sulfoxyde) en goutte à goutte.
7. Fermer le tube à congélation.
8. Mettre les tubes à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant une heure ensuite passer  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit.
9. Transférer les tubes dans l'azote liquide :  $\text{N}_2$ .

### **Annexe 2. Préparation des milieux de culture : DMEM (DULBECO'S MODIFIED EAGLE MEDUIM)**

Le milieu de culture cellulaire est préparé à partir d'un milieu en poudre, fourni par le fabricant sous forme de flacons.

#### **Présentation :**

Les flacons de milieu en poudre pour reconstitution d'un litre de milieu.

Les flacons de milieu en poudre pour reconstitution de 5 litres de milieu.

Le milieu en poudre doit être :

## Annexes

---

- Reconstitué dans l'eau permutée ou purifiée.
- Adjonction de bicarbonate de sodium et solution d'antibiotique-antimycotique.
- Ajuster à PH 7,4.
- Stérilisé par filtration sur membrane de 0,45 puis 0,22 µm

### **Mode opératoire :**

1. Mesurer 90% de volume final d'eau permutée dans un flacon contenant un barreau aimanté.
2. Placer le flacon sur agitateur magnétique.
3. Verser le contenu du flacon de milieu en poudre.
4. Ajouter du bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) à raison de 1,2 g/litre.
5. Ajouter la solution antibiotique –antimycotique à raison de 2 ml/litre.
6. Laisser tourner sur agitation magnétique à raison de 2 ml / litre.
7. Ajouter le restant d'eau permutée.
8. Mesurer le PH sur une petite quantité de milieu prélevée dans un flacon.
9. Ajuster le PH si nécessaire à 7,4 par adjonction de gouttes d'acides chlorhydrique.
10. Pré filtre (sous hotte) sur membrane filtrante de 0,45 µm.
11. Pré filtre (sous hotte) sur membrane filtrante de 0,22 µm.
12. Répartir le milieu, selon convenance, en flacons de 100 ; 250 ; 500ml.
13. Placer les flacons à l'étuve (37°C) pour au moins 48h (control de stérilité).
14. Conserver les flacons au réfrigérateur à +4°C.
15. Avant utilisation, ramener à 37°C au bain marie.
16. Avant l'utilisation on ajoute le SVF.

On peut préparer une plus grande quantité de milieu, en respectant la proportion des additifs (bicarbonate de sodium et antibiotique).

### **Annexe 3. Préparation de la solution**

#### **ANTIBIOTIQUE/ ANTIMYCOTIQUE**

##### **Composition :**

La solution est constituée du mélange d'un antimycotique, l'Amphotéricine B (Fungizone), et d'une association de deux antibiotiques, soit Kanamycine, soit Gentamycine et Néomycine :

## Annexes

Gentamycine sulfate	2,5g
Néomycine sulfate	2,5g
Amphotéricine B	0,28g
Eau permutée stérile	100ml

### Mode opératoire :

1. Mesurer 100ml d'eau permutée stérile dans un erlen muni d'un barreau aimanté.
2. Placer l'erlen sur un agitateur magnétique.
3. Peser et transférer dans l'erlen chacun des composants (attendre la dissolution complète de chaque composant avant d'ajouter le solvant).
4. Pré filtre sous hotte sur membrane filtrante de 0,45 $\mu$ m.
5. Filtrer sur membrane filtrante de 0,22 $\mu$ m.
6. Répartir dans des tubes à congélation, à raison de 2ml / tube
7. Conserver les tubes au congélateur à -20°C.

### Annexe 4. Préparation de la Trypsine – versene

#### Mode opératoire : (pour la préparation d'un litre de solution)

1. Préparer une solution de rouge de phénol à 0,5% dans de l'eau permutée

Comme on n'utilisera que 0,4ml/L de cette solution dans la préparation finale, il ne sera pas nécessaire d'en faire beaucoup, 50 ml suffiront amplement

2. Faire dissoudre 0,25g de rouge phénol en poudre dans 50 ml d'eau permutée.
3. Verser 900ml d'eau permutée dans un flacon contenant un barreau aimanté.
4. Peser et ajouter les ingrédients suivants dans les proportions données :

Na CL	8g
KCL	0,4g
CH <sub>12</sub> O <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O	1g
NaHCO <sub>3</sub>	0,58g
Trypsine (poudre)	2,5g
Verséne EDTA	0,2g

## **Annexes**

---

5. Mettre le flacon sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète.
6. Ajouter 0,4ml de la solution de rouge phénol.
7. Ajouter 2ml de solution (antibiotique-antimycotique).
8. Compléter jusqu'à un litre avec de l'eau permutée stérile.
9. Préfiltrer sous hotte sur membrane filtrante 0,4 $\mu$ m.
10. Filtrer sous hotte sur membrane filtrante à 0,22 $\mu$ m.
11. Répartir en flacon.
12. Conserver à -20°C.
13. Avant utilisation, décongeler et ramener à 37°C au bain marie.

### **Annexe 5. Procédé de Trypsination**

#### **Mode opératoire :**

1. Vider la boîte à trypsiner de son milieu.
2. Rincer le tapis cellulaire 2 fois avec la trypsine-versene; (Verser = 5 ml de la trypsine-versene dans la boîte, rincer par mouvement circulaire, jeter).
3. Verser de la trypsine-versene , en quantité suffisante pour recouvrir le tapis, Rincer et jeter le surnageant ,procéder en surveillant le tapis, car la trypsine agit très vite .
4. Reverser de la trypsine, rincée, jeter le surnageant mais en laissant un mince film de trypsine à la surface du tapis.
5. Laisser agir quelques instants, tout en surveillant le tapis cellulaire.
6. Dès que le tapis commence à se détacher, accélérer le processus par petits tapotements sur la boîte.
7. Ajouter 10 ml de milieu DMEM\*.
8. Remettre les cellules trypsinées en suspension par aspirations-refoulements énergiques au moyen d'une pipette.

#### **Répartition de la suspension cellulaire dans les boîtes de cultures (2methodes) :**

1. Récupérer cette suspension et la répartir à part égale entre les boîtes correspondantes contenant déjà la quantité de milieu DMEM.
2. Trypsiner ainsi toutes les boîtes, l'une après l'autre, en transférant au fur et à mesure les suspensions de cellules dans un erlen contenant la quantité totale de DMEM en fonction de la capacité et nombre de boîtes prévus.  
Bien mélanger cette suspension, et la répartir à part égale entre les boîtes prévues.

## Annexes

3. Agiter fréquemment l'eren afin de maintenir les cellules en suspension et permettre une répartition homogène des cellules dans les boites.
- **Marquer les boites** : Nom des cellules, N°\_ de passages, date de mise en culture.

### Annexe 6. Titrage du virus de la clavelée sur microplaques à 96 puis

#### Mode opératoire :

1. Choisir une boite présentant un tapis confluent.
2. Trypsiner et récupérer les cellules dans 5ml de milieu.
3. Procéder la numérotation cellulaire de la suspension obtenue.
4. Préparer une suspension cellulaire à 100.000  $\phi$  / ml dans du DMEM à 10% SVF.
5. Sur une microplaque marquer 8 rangées verticales de 8 cupules, correspondants aux dilutions du virus allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-10}$ .
6. Prévoir la dernière rangée verticale de 8 cupules pour les cellules témoins (non infectés).
7. Répartir 100 $\mu$ l de la suspension cellulaire dans toutes les cupules de la microplaque.
8. Préparer une série de dilution de virus à titrer, allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-10}$  dans du DMEM :
  - Répartir 0.9 ml du milieu DMEM dans 10 tubes à congélation stériles.
  - Verser 0.1 ml de la suspension virale à titrer dans 1<sup>er</sup> tube.
  - Traverser 0.1 ml du 1<sup>er</sup> au 2<sup>ème</sup>, du 2<sup>ème</sup> au 3<sup>ème</sup> .... (Cf. Schéma ci-dessous) :

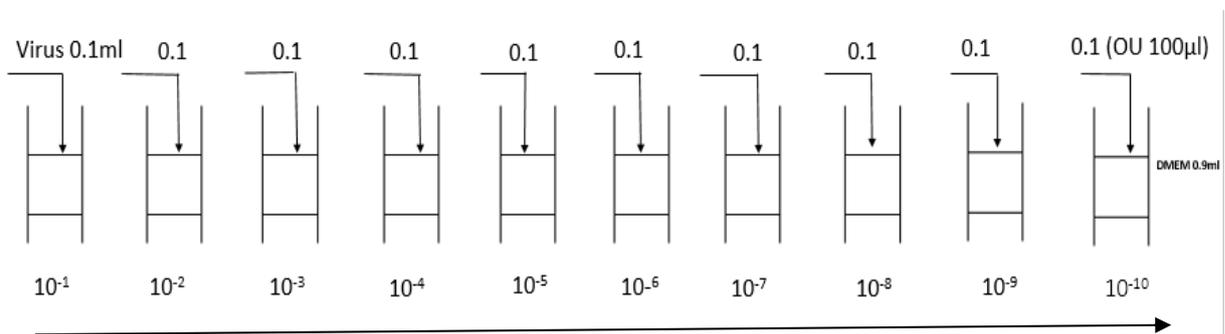


Fig. : Dilution décimale en série de la suspension virale

9. Répartir 100 $\mu$ l des dilutions de virus dans les cupules verticales correspondantes.
10. Répartir 100 $\mu$ l de milieu à 10% SVF dans les cupules témoins.
11. Fermer la plaque, et incuber à 37°C dans l'étuve à 5% CO<sub>2</sub>

## Annexes

---

-