

ZV0001611

n° d'ordre 122

Université Cheikh Anta-Diop de Dakar

Faculté des Sciences et Techniques



MEMOIRE DE D. E. A. DE BIOLOGIE ANIMALE

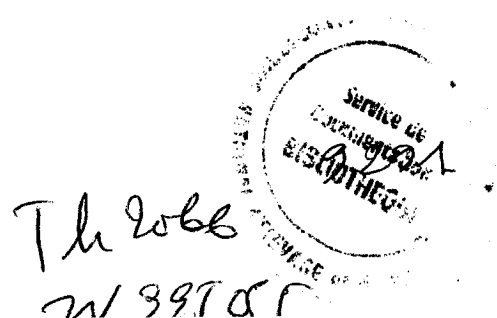
Présenté par

N'DEYE FATOU TALL

**Contribution à l'étude du virus de la
Dermatose Nodulaire Contagieuse Bovine sur
culture de cellules primaires de mouton.**

soutenu le 28 Juin 1999 devant la commission d'examen :

Président :	Mr. Mady	NDIAYE
Membres :	MM Omar Thiom	THIAW
	Yaya	THIONGANE
	Meïssa	TOURE



Aux membres de ma famille,

A mes amis

Affection et Estime.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire National de l'Élevage et de Recherche Vétérinaire (**L.N.E.R.V**) de l'Institut Sénégalais de Recherche Agricole (**I.S.R.A**), au département de virologie.

Je remercie très sincèrement le Professeur **O. T. THIAW** de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar pour sa collaboration efficace et chaleureuse. Vos suggestions pour une rédaction claire et concise m'ont beaucoup éclairé tout au long de la réalisation de ce document. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

Mes remerciements vont également :

Au **Dr. Y. THIONGANE** chercheur à l'ISRA, qui a bien voulu m'encadrer malgré ses nombreuses sollicitations quotidiennes. La rigueur scientifique qui vous anime, les remarques pertinentes que vous faites à chaque fois que l'on vous présente un travail, m'ont beaucoup aidé quant à l'orientation de mes recherches. Soyez assuré de ma gratitude et de mon respect.

Au **Dr M. NDIAYE** de la Faculté des Sciences et Techniques de Dakar qui nous fait l'honneur de présider le jury.

Au Professeur **M. TOURE** de la Faculté de Médecine et de Pharmacie: c'est un grand honneur pour nous de vous compter parmi les membres de notre jury.

A tout le personnel technique du département de virologie du **L.N.E.R.V** qui m'a apporté toute l'assistance technique nécessaire à l'élaboration de ce travail.

A Monsieur **O. MBODJ**, responsable du centre de formation et des bases de données du service informatique de la Direction Générale de l'ISRA, qui a mis toute sa compétence et son savoir faire à ma disposition.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	2
1.Généralités sur la Dermatose Nodulaire Contagieuse Bovine (DNCB)...	3
1.1.Définition	3
1.2. Symptômes	4
1.3. Importance de cette maladie.	4
2.Généralités sur les cultures de cellules	8
2.1. Définitions	9
2.2. Principe des systèmes de cultures de cellules	9
2.3. Types de cultures cellulaires	11
2.3.1. Les cellules de première explantation ou cellules primaires.	11
2.3.2. Les cellules de souche	13
2.3.3. Les cellules de lignée continue	13
2.4. Intérêt des cultures de cellule	15
MATERIEL ET METHODES	15
1. Matériel	16
1.1.Choix du foetus	16
1.2. Souche virale ou inoculum	16
1.3. Milieux de cultures et solutions tampons de trypsine	16
1.3.1. Les solutions salines	16
1.3.2. Les milieux nutritifs	16
1.4. Les antibiotiques et antifongiques	17
1.5. Matériels de laboratoire	17
2. Méthodes	18
2.1. Technique de culture de reins de mouton	18
2.1.1. Prélèvement des reins	18
2.1.2. Dissection du rein	18
2.1.3. Trypsination du cortex rénal	21
2.1.4. Entretien des cellules	23
2.1.5. Conservation des cellules	24
a/ Une conservation par ralentissement du métabolisme	24
b/ Une conservation par congélation ou cryoconservation	24

2.2. Technique de culture de testicules de mouton.....	24
2.3. Technique d'inoculation des cellules.....	25
2.3.1. Dilution de la souche virale.....	25
2.3.2. Infection des cellules.....	26
2.4. Méthodes d'identification du virus de la DNCB et titrage	26
2.4.1. Observation de l'effet cytopathogène (ECP)27
a/ Examen à l'état frais.....	27
b/ Examen après coloration au Giemsa.....	..27
2.4.2. Fixation des anticorps fluorescents.....	..28
2.4.3. Titrage du virus de la D.N.C.B. dans les différentes récoltes.....	30
2.4.4. Calcul de la dose infectante 50% (DI 50% ou DICT 50)32
2.4.5. Application du test U de MANN ET WHITHNEY.....	33
RESULTATS	34
1. Evolution des tapis cellulaires non infectés34
1.1. Observation des cellules rénales34
1.2. Observation des cellules de testicules34
2. Evolution des tapis de cellules infectées.....	35
2.1. Observation de l'effet cytopathogène (ECP)	35
2.2. Observation de la fluorescence spécifique.....	39
2.3. Lecture des plaques de titrage.....	..39
2.4. Calcul de titre par la méthode de SPEERMANN – KARBER.....	40
2.5. Test U de MANN ET WITHNEY.....	40
DISCUSSION.....	43
1. Caractères de cellules non infectées.....	43
2. Caractères des cellules infectées.....	44
RESUME ET PERSPECTIVES45
BIBLIOGRAPHIE48

INTRODUCTION

Les êtres vivants sont caractérisés par une organisation ou plutôt une hiérarchie d'organisations complexes qui va de l'atome à la molécule. Ces molécules s'imbriquent à leur tour selon des schémas précis en organites intracellulaires. Ceux-ci s'intègrent pour former des cellules en obéissant à quelques plans fort simples. En effet, les cellules de même genre se groupent (dans la majorité des espèces) en tissus. Plusieurs tissus différents forment des organes, associés pour constituer des individus harmonieux.

La cellule représente la plus petite portion de matière vivante qui puisse vivre isolée de manière complète et, capable de se reproduire. En effet, toutes les cellules d'un organisme dérivent les unes des autres par mitose, qui est l'un des phénomènes les plus fondamentaux de toute la biologie. A l'issue de la mitose, une cellule somatique initialement diploïde ($2N$ chromosomes) conduit à deux cellules filles identiques porteuses de la même information génétique. Ce phénomène si bien réglé, dont la fréquence est rigoureusement contrôlée dans un tissu normal, peut devenir incohérent (CAROSELLA, 1995). Cette anomalie donne naissance à une cellule dite transformée. Cette transformation se traduit par une modification du nombre de chromosomes, c'est l'hétéropléidie; au lieu d'avoir $2N$ chromosomes (diploïdie), ces cellules transformées en acquièrent $3N$, $4N$, $8N$ chromosomes. De plus, les cellules se présentent sous des formes très variées. Dans chaque tissu, les cellules ont souvent une morphologie caractéristique, elles sont soit de type fibroblastique, soit de type épithélial, soit de type endothélial. Cette morphologie peut être influencée par l'environnement de la cellule, surtout lorsqu'elle est en culture. Par exemple, le fibroblaste en culture, peut être quasi sphérique en milieu liquide (agarose), en forme de triangle ou de losange aplati sur couche mince de plasma coagulé non orienté, ou en fuseau épais et allongé sur une lame de verre striée. L'utilisation de la culture de cellules a contribué à une meilleure compréhension des grandes questions que se pose la biologie des eucaryotes, notamment immortalité et cancer, la différenciation cellulaire, le développement embryonnaire, le phénomène de réparation tissulaire.

Parallèlement à cette cellule vivante totalement autonome, il existe d'autres organismes comme les virus qui sont des parasites stricts.

De nos jours, la culture in vitro de cellules en provenance d'organismes animaux est devenue une des techniques les plus utilisées pour l'étude des virus. Elle permet de faire face aux exigences des virus qui ne se multiplient qu'au sein des cellules vivantes et nous évite de travailler sur un animal ou un organe maintenu en survie.

Le virion ou particule infectieuse présente quatre traits distinctifs dont les trois premiers caractérisent un parasitisme absolu. En effet, le virion contient un seul type d'acide nucléique, soit ribonucléique, soit désoxyribonucléique, jamais les deux à la fois. Incapable de croître ou de se diviser, il se reproduit uniquement à partir de son matériel génétique. Il ne possède pas dans son génome l'information nécessaire à la synthèse de ses métabolites essentiels et à la formation des liaisons de haut potentiel énergétique que cette synthèse exige. Le virion ne la trouve que dans la cellule où il se multiplie et dont il détourne à son usage les systèmes enzymatiques préexistants. De même, pour synthétiser ses propres protéines, il utilise les ribosomes et les acides ribonucléiques de transfert de la cellule qu'il infecte. Le génome des virus ne porte aucune information qui permette la production des enzymes du cycle énergétique, la synthèse de protéines ribosomiques, celle de l'ARN ribosomique et de l'ARN de transfert. Enfin, dernière caractéristique, le virion présente une structure définie, à symétrie cubique, ou hélicoïdale (TOURNIER, 1976).

En virologie vétérinaire, les cultures cellulaires sont utilisées dans l'isolement, l'identification et la multiplication du virus (Asso, 1964). Elles permettent la mise au point et la production de vaccins utilisés dans les campagnes de prophylaxie des maladies virales du bétail. Ainsi que l'élaboration de tests de diagnostic tels que la technique de neutralisation des effets cytopathogènes du virus in vitro.

1. Généralités sur la Dermatose Nodulaire Contagieuse Bovine (DNCB)

1.1. Définition

La Dermatose Nodulaire Contagieuse Bovine (DNCB) est une maladie infectieuse d'origine virale qui affecte principalement les bovins notamment les zébus, les taurins et les buffles domestiques.

L'agent responsable est un virus de la famille des poxviridae, genre *Capripoxvirus*, dont le virus type est le virus Neethling.

Il s'agit d'un virus à ADN à symétrie hélicoïdale, enveloppé. Ce virus est transmis par le contact direct avec les animaux malades mais, surtout par l'intermédiaire de piqûres

de divers arthropodes comme les mouches, moustique

Il s'agit d'un virus à ADN à symétrie hélicoïdale, enveloppé. Ce virus est transmis par le contact direct avec les animaux malades mais, surtout par l'intermédiaire de piqûres de divers arthropodes comme les mouches, moustiques.

1.2. Symptômes

Cette maladie peut évoluer sous différentes formes allant de la forme aiguë grave à la forme fruste bénigne.

Dans la forme aiguë, après une incubation de 4 à 14 jours, le premier signe clinique est une hyperthermie (41°C) d'une dizaine de jours associée à des symptômes généraux tels que l'abattement, le manque d'appétit. Ensuite, apparaissent des signes cutanés caractéristiques de cette virose : des poils hérissés et des nodules dont la taille varie entre 0,2 et 5 cm de diamètre sur l'encolure, le dos, les cuisses et les jambes de l'animal, (Fig. 1). Ces nodules cutanés persistent pendant une semaine, puis se dessèchent et tombent laissant place à des lésions qui cicatrisent en peu de temps en l'absence d'infections bactériennes secondaires.

En plus de ces signes cutanés, des nodules se développent dans certains organes profonds comme la trachée et l'intestin. C'est la forme grave de la DNCB qui conduit à une asphyxie, une inrumination, un avortement voire la mort dans 2 à 10 % des cas (LEFEVRE, 1991).

1.3. Importance de cette maladie

La DNCB est une maladie remarquable par son incidence économique dans les élevages de bovins. Outre la mortalité que la dermatose provoque dans 2 à 10 % des cas, elle cause des pertes économiques consécutives à l'amaigrissement associé à une infertilité et à des avortements. Elle laisse généralement des lésions indélébiles sur les cuirs. La qualité de ces derniers, sérieusement affectée, leur fait perdre toute valeur marchande dans l'industrie du cuir (NEGALBAYE, 1988).

De plus, la DNCB est inscrite sur la liste A selon le code zoo-sanitaire international de l'office International des Epizooties (O.I.E). Cette liste A comprend des maladies transmissibles qui ont un grand pouvoir de diffusion et une gravité particulière.



Figure 1 : Un bovin atteint de DNCB. La flèche indique les nodules cutanés.

Ces maladies sont à déclaration obligatoire car elles sont capables de s'étendre au-delà des frontières nationales, avec des conséquences socio-économiques et sanitaires qui peuvent être graves. Surtout leurs incidences sur le commerce international des animaux et des produits animaux sont importantes (CHILLAUD, 1996).

Sur le plan épidémiologique, la DNCB est une virose rencontrée exclusivement sur le continent africain, au sud du Sahara et à Madagascar. Elle y sévit sous forme d'épizooties séparées par des périodes de silences plus ou moins longues. Toutefois, son extension depuis 1970 est préoccupante (Fig. 2).

Au Sénégal, cette maladie a été signalée, pour la première fois, en 1988. Les premiers cas furent notés en saison sèche chez les buffles élevés aux environs de la ville de Saint-Louis. Et, au cours de la saison des pluies, la maladie s'est propagée aux bovins vivant dans toutes les zones écologiques du Sénégal (THIONGANE, 1988).

Aucun traitement spécifique n'est disponible à ce jour. Mais il est possible de combattre les infections secondaires, par un traitement général à base d'antibiotiques associé à un traitement local des nodules et plaies cutanés. Le moyen de lutte le plus efficace contre la DNCB reste la vaccination. A l'heure actuelle, un vaccin contre la clavelée, maladie des moutons due à un poxvirus voisin de celui de la DNCB, est utilisée dans les campagnes de vaccination contre la DNCB. Ce vaccin hétérologue est efficace mais présente l'inconvénient de provoquer une immunité moins solide et moins durable qu'un vaccin homologue. De plus, ce vaccin ne peut être utilisé dans les pays où la clavelée n'existe pas.

Ce travail s'inscrit dans un objectif global de mise au point d'un vaccin homologue, c'est à dire d'un vaccin issu d'un virus de la DNCB. Particulièrement, notre étude tente de déterminer les conditions *in vitro* optimales de répllication d'une souche de virus de DNCB, isolée lors d'une épizootie survenue chez les bovins du Sénégal en 1988 (THIONGANE, 1988). A cet effet, nous analysons l'évolution de la cytopathogénéicité de la souche virale sur des cellules de reins et de testicules de mouton pour sélectionner la lignée cellulaire la plus sensible.

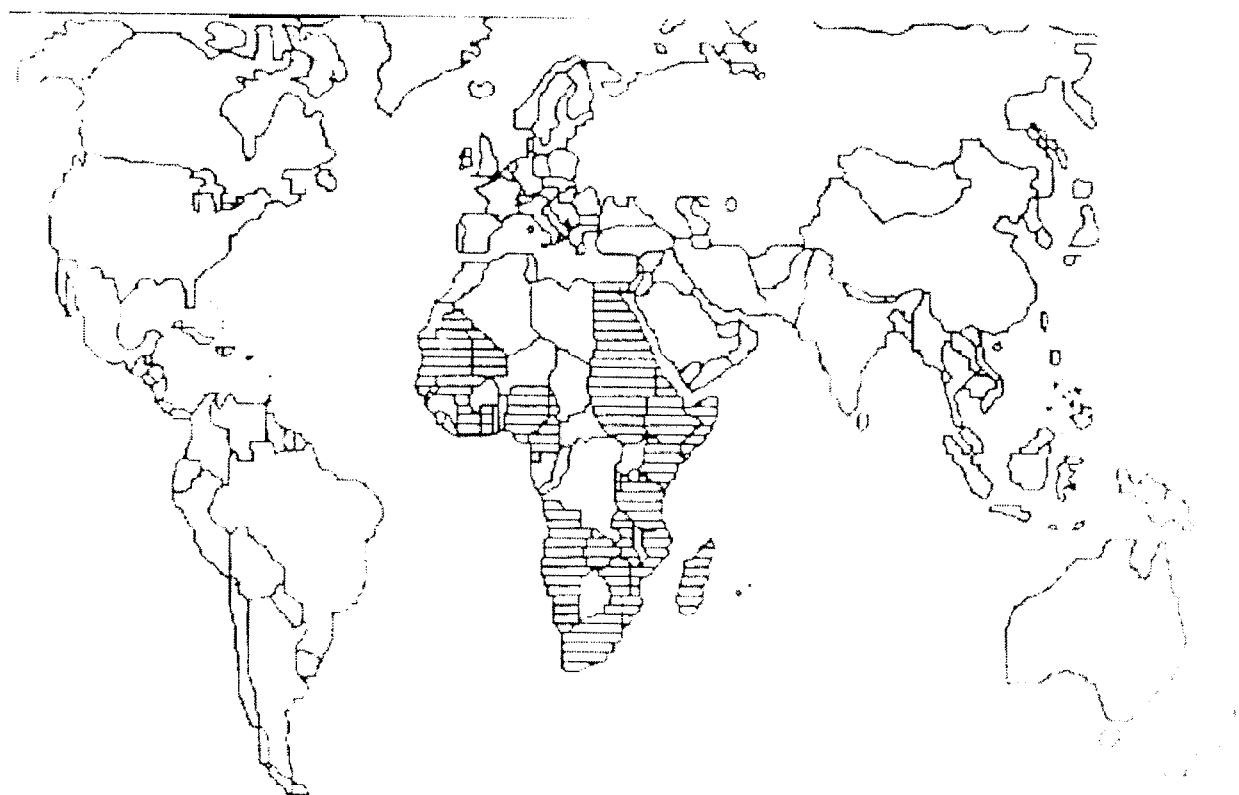


Figure 2 : Carte épidémiologique de la D.N.C.B.
(Annuaire de la Santé animale FAO - WHO - OIE, 1989).

En pratique, nous allons d'abord réaliser des cultures de cellules de reins et de testicules de mouton, ensuite les inoculer avec la souche virale. Le degré de sensibilité de ces cellules est déterminé par l'observation de l'évolution des lésions cytopathiques dans le temps. Des inclusions intracellulaires caractéristiques de cette infection virale pourront être mises en évidence grâce à des techniques de coloration cytologique (la coloration de Giemsa) et immunologique (le test d'immunofluorescence indirecte). Un calcul du titre viral sera effectué en fonction du type de cellules utilisées avant de conclure sur la différence de sensibilité entre ces deux types de cellules.

2. Généralités sur les cultures cellulaires

La culture cellulaire s'enracine dans deux concepts formulés dès le milieu du XIX^{ème} siècle. Le premier faisait de la cellule l'unité vitale fondamentale, capable d'avoir une existence autonome (**SCHLEIDEN** et **SCHWANN**, cités par **FIRKET**, 1964). **Le second énoncé** par **CLAUDE BERNARD** (cité par **MAURIN** 1976a) établissait la notion d'homéostasie et de constance du milieu interne.

Ensuite, au XX^{ème} siècle, la culture de tissus fit ses premiers pas grâce à **HARRISON** qui, en 1907, démontra le phénomène de croissance des cellules nerveuses en mettant en culture des fragments de ganglions spinaux de grenouille dans du coagulum. En 1912, **CARREL** définit les règles d'asepsie et mit en évidence le rôle de certains extraits embryonnaires sur le développement du tissu conjonctif. Ces travaux posent les bases de l'étude des besoins nutritionnels des cellules.

Mais, c'est seulement au milieu de notre siècle, à partir de 1950, qu'est véritablement née la culture cellulaire. Elle bénéficia à la fois du développement de la technique de dispersion des cellules à partir de tissus et organes par l'action des enzymes protéolytiques et de l'utilisation d'un support de culture comme le verre neutre qui évite l'emploi de coagulum.

En 1952, **GEY** et coll. isolent la première lignée de cellules tumorales d'origine humaine, les cellules HeLa. Depuis lors, la culture de cellules est devenue l'outil de choix de la biologie des organismes eucaryotes.

2.1. Définitions :

Ces définitions concernent les différents types de cultures.

La culture de cellules indique les systèmes où les cellules sont capables, non seulement de survivre, mais aussi de se diviser, tout en restant séparées les unes des autres, ou du moins sans conserver une organisation structurale rappelant le tissu d'origine (**FRESHNEY**, 1986).

La culture de tissus concerne un tissu qui a conservé une organisation qui lui est spécifique et continue soit à fonctionner, soit à croître tout au long des manipulations.

La culture d'organe désigne des cultures où un organe a conservé sa structure organisée et ses fonctions spécifiques (Fig. 3).

2.2. Principe des systèmes de cultures de cellules

Le problème consiste à transformer le tissu en une suspension homogène de cellules séparées qui peuvent être cultivées de deux manières :

- soit une culture en suspension : c'est le cas des cellules lymphoblastiques de souris (**OWENS** et coll., 1953). Ce sont des cultures dont la richesse en cellules évolue à la manière des cultures bactériennes (sous forme de colonies). Elles se prêtent particulièrement bien aux études sur la production massive de virus. Cette méthode présente cependant une limite qui est l'utilisation d'un milieu spécial conçu pour cellules non adhérentes. C'est pourquoi, seules les cellules dites transformées se prêtent à cette technique car elles n'exigent pas un support pour croître.
- soit une culture en stationnaire : c'est le cas des cellules véro provenant de rein de singe vert d'Afrique. Ce sont des cellules qui tombent au fond et se collent au support. C'est la technique la plus répandue car presque toutes les cellules s'y prêtent. Ici, la qualité du support devient essentielle : verre Pyrex ou verre neutre, plastique spécial. Cependant, l'adhésion des cellules à leur support est un processus assez mal connu. Il nécessite l'intervention de facteurs d'attachement protéiques (fibronectine, collagène,...) apportés par le milieu de culture notamment le sérum ou sécrétés par les cellules. Ces facteurs d'attachement s'adsorbent aux surfaces et fixent les cellules par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

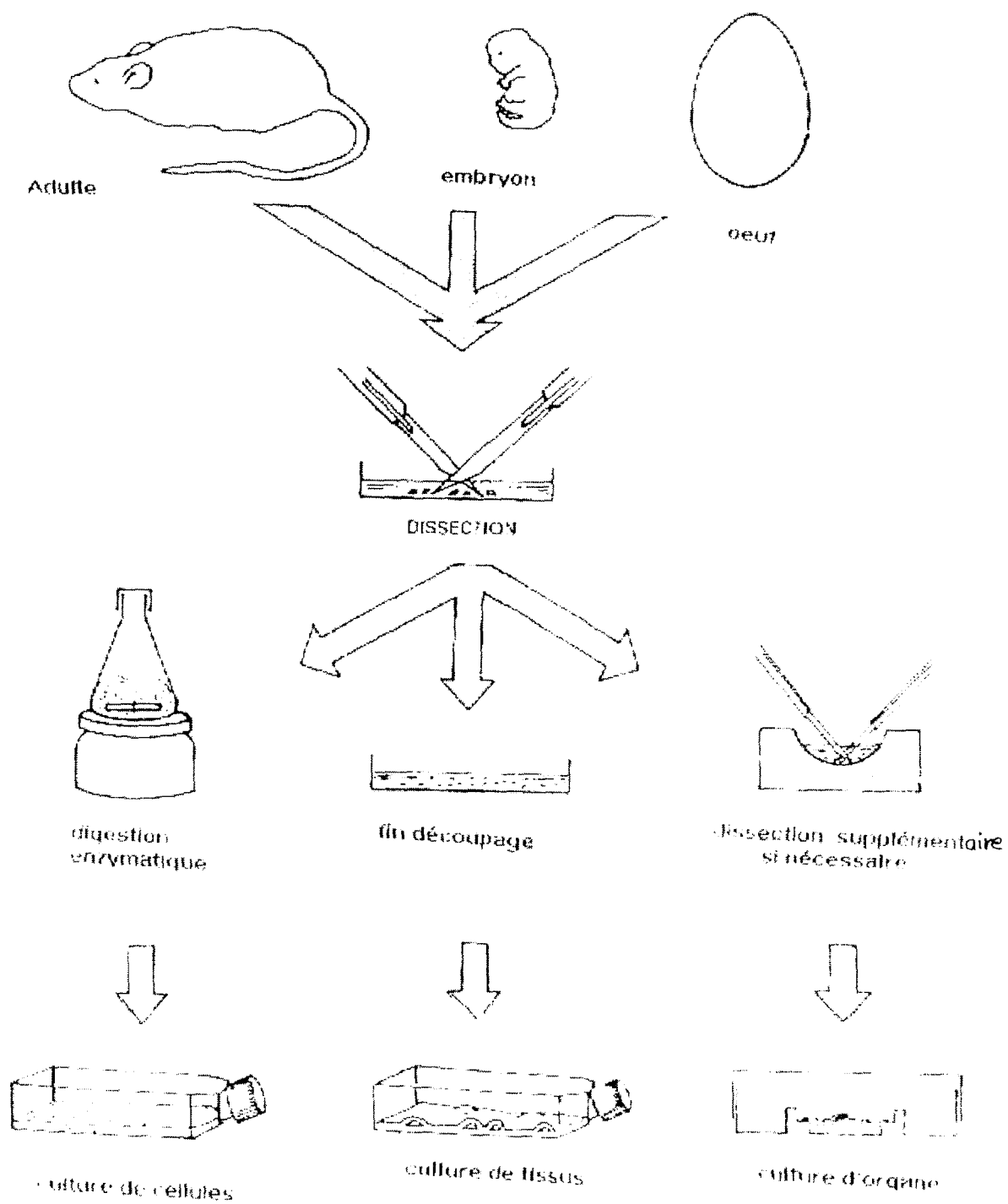


Figure 3 : Les Techniques de préparation des différents types de culture

[FRESHNEY, 1987]

Actuellement, aussi bien pour la culture en stationnaire que pour celle en suspension, on peut avoir divers systèmes de culture de cellules notamment le système dit ouvert de type spinner (Fig. 4) ou roller (Fig. 5) et le système dit fermé.

Ce système fermé correspond à des cytotisseurs de conception sophistiquée dans lesquels tous les paramètres de culture sont contrôlés de façon à maintenir constants la densité cellulaire et les échanges gazeux. Ces systèmes fermés se répartissent eux mêmes en deux catégories :

le système fermé avec agitation, proche des fermenteurs bactériens. Il donne des densités cellulaires limitées car n'excédant pas 10^7 cellules/ml. Développé à l'origine pour la culture en suspension, il permet la culture des cellules adhérentes grâce à l'utilisation de microporteurs ou de techniques d'encapsulation.

le système fermé sans agitation, avec circulation de milieu en continu. Ces systèmes fournissent des densités cellulaires très élevées (10^{10} cellules/ml), proches de celles des tissus. Ils s'appliquent aussi bien à la culture de cellules adhérentes que non adhérentes.

Lorsque toutes les conditions requises pour le bon développement d'un tissu sont réunies (pH, température, nutriments, stérilité...) les cellules croissent et se multiplient. On peut parler ainsi de culture *in vitro*.

2.3. Types de cultures cellulaires

Les cultures de cellules peuvent être différenciées par leur capacité à être entretenues par passages successifs. On distingue essentiellement deux types :

2.3.1 Les cellules de première explantation ou cellules primaires.

Elles ont une durée de vie très limitée car une dégénérescence non spécifique finit toujours par apparaître au bout de 2, 3, ou 4 trypsinations ou passages. Elles résultent de la dissociation d'un organe, soit en petits fragments explantés, ou soit en unités cellulaires obtenues par la méthode de trypsination. Celle-ci permet d'obtenir, à partir d'un organe donné, une suspension de cellules susceptibles de se fixer au verre et de se multiplier pour donner une couche continue d'une seule assise ou couche monocellulaire. Ce résultat est obtenu par digestion de la trame conjonctive de l'organe au moyen d'une solution de trypsine.

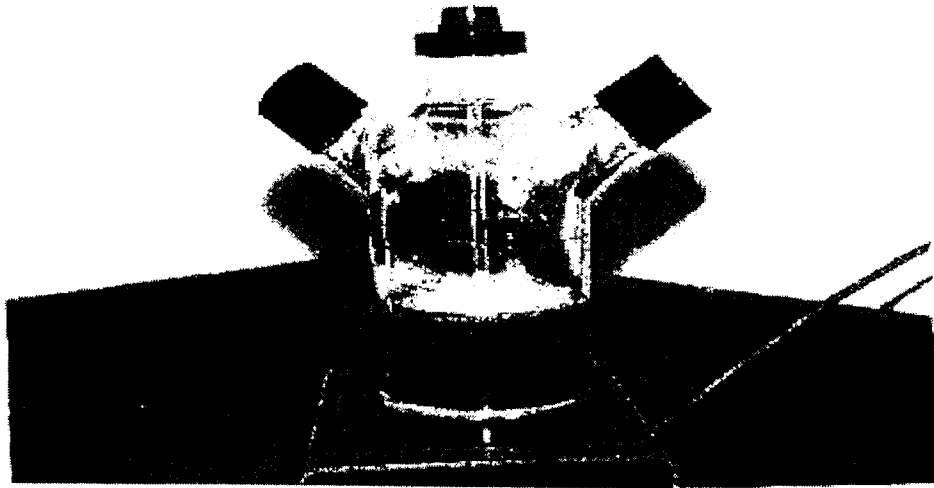


Figure 4 : Culture en suspension Type spinner.

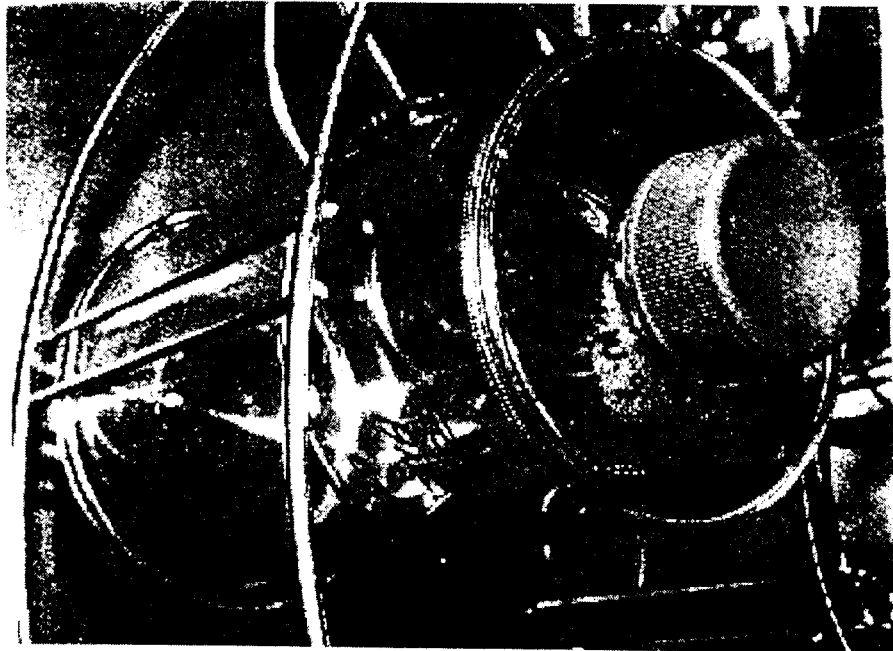


Figure 5 : Culture en stationnaire type roller.

La trypsine, enzyme extraite du pancréas du porc est susceptible de couper toute liaison protéique de type lys - arg ou arg - arg. Aujourd'hui grâce au génie génétique, la trypsine que l'on trouve dans le commerce est purifiée et lyophilisée.

Lorsque la culture primaire est réussie, il apparaît de belles cellules en couche monocellulaire que l'on a intérêt à repiquer pour constituer des cultures secondaires. Cette opération s'effectue en décollant les cellules par la trypsine, en les remettant en suspension dans du milieu neuf et en les ensemençant de nouveau dans d'autres flacons de culture. Pour un meilleur rendement, il est d'usage de les utiliser le plus tôt possible, car leur sensibilité à certains virus diminue au fil des passages.

2.3.2 Les cellules de souche.

Ce sont des cellules génétiquement normales. Elles peuvent être entretenues pendant un grand nombre de passages (de 40 à 60). C'est le cas des cellules diploïdes humaines.

2.3.3 Les cellules de lignée continue.

Ce sont des cellules tumorales, pathologiques et repiquables indéfiniment. Elles proviennent soit de l'explantation d'une tumeur maligne humaine ou animale, soit de la transformation *in vitro* ou *in vivo* de cellules normales (MONTAGNIER, 1976). Cette transformation pouvant résulter d'une mutation spontanée ou provoquée par un agent mutagène de type oncogène physique, chimique ou viral. C'est le cas des cellules véro issues de cellules de rein de singe vert d'Afrique.

La transformation se manifeste généralement par :

- une brusque augmentation de la vitesse de croissance des cellules, par exemple si le cycle de multiplication normal des cellules était de 24 heures, il est réduit à 14 ou 16 heures (Fig. 6).
- une tendance au chevauchement des cellules qui ont perdu ainsi leur inhibition de contact.
- des cellules qui peuvent pousser en suspension (sans s'accrocher à un support du fait de la perte de leur cytosquelette).
- un changement du nombre de chromosomes, les cellules deviennent hétéroïdes.
- une diminution des besoins en sérum nutritif.

Compte tenu de leur grande résistance, on peut les conserver pendant très longtemps par congélation à -70°C ou dans de l'azote liquide (-196°C).

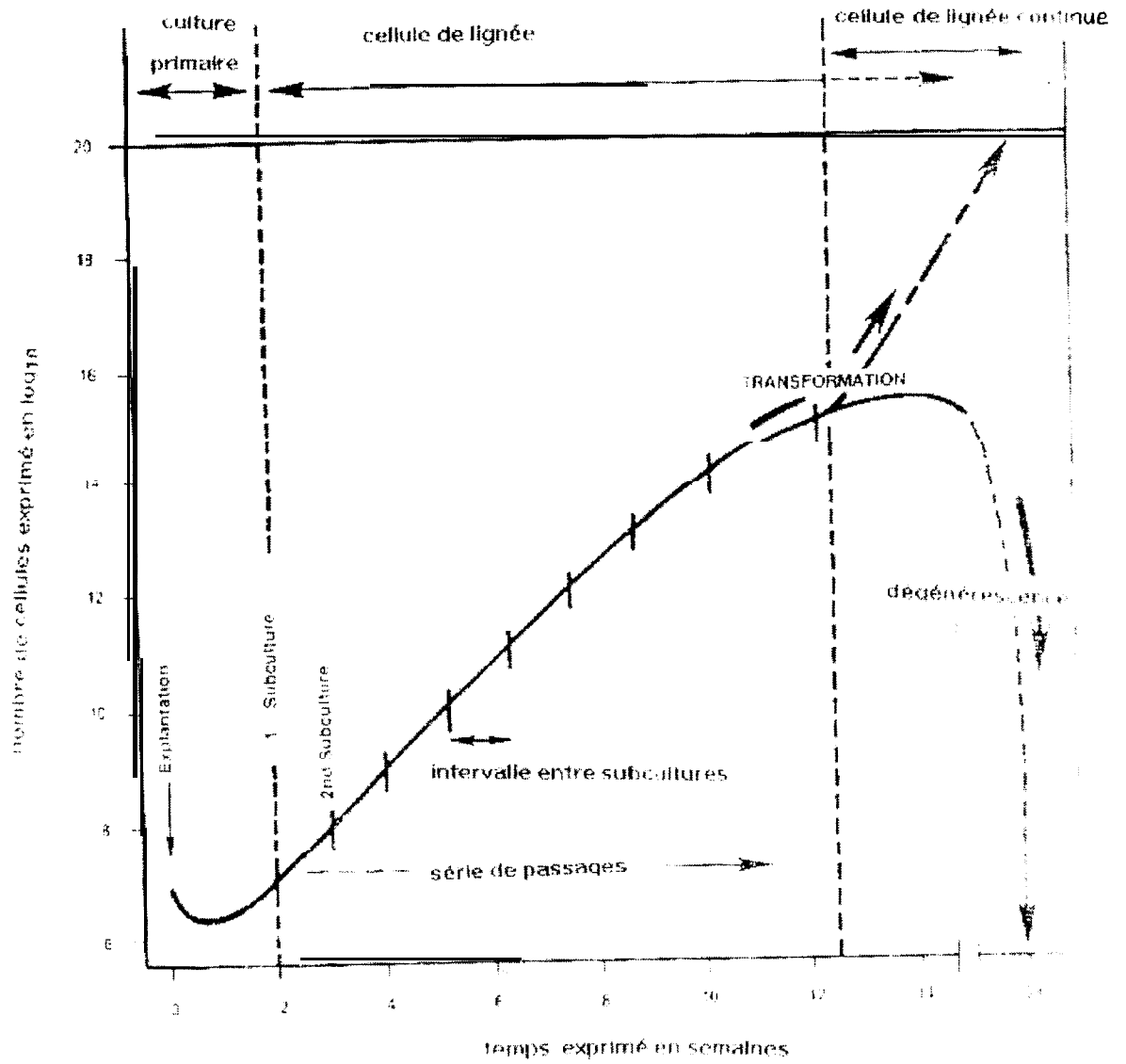


Figure 6: Courbe d'évolution d'une cellule en culture [FRESHNEY, 1987]

2.4. Intérêt des cultures de cellules

Le développement des techniques de cultures cellulaires a permis de grandes avancées dans la biologie en général et la virologie en particulier. Elle a permis d'avoir une production massive de cellules homogènes et toutes les cellules peuvent provenir d'un même clone. On peut les synchroniser (par choc thermique, blocage de certaines synthèses, déplacement mécanique ou enzymatique de cellules en mitoses), les astreindre à une fonction bien définie, avec une très grande reproductibilité.

Plus particulièrement en virologie, puisque les virus ne se multiplient que dans des cellules vivantes, les cultures de cellules constituent un support à l'activité du virus (MAURIN, 1976a), elles permettent alors :

- l'isolement et l'identification par neutralisation du virus,
- le titrage du virus,
- la production éventuelle de vaccins.

De plus, la culture de cellules a contribué à l'étude des différentes étapes biochimiques du développement des virus animaux. Cette étude étant impossible à effectuer chez l'animal, compte tenu de la diversité des réactions enregistrées (ASSO, 1964).

**MATERIEL
ET METHODES**

1. Matériel

Des souches virales de DNCB sont cultivées sur des cellules de reins et de testicules de mouton.

1.1. Choix du fœtus

Les reins et les testicules sont issus d'un embryon mâle de mouton de 30 cm de long et âgé de 14 à 15 semaines environ.

1.2. Souche virale ou inoculum

Il s'agit d'une souche virale isolée à partir d'un nodule cutané de bovin atteint de DNCB en 1988. Cette souche a subi 20 passages sur cultures de reins de mouton et elle titre : $10^{6,4}$ DICT 50.

1.3. Milieux de cultures et solutions tampons de trypsine

Les catégories de solutions et de milieux sont au nombre de deux :

1.3.1 Les solutions salines.

Elles sont communément appelées solutions de lavage, comme celles de Phosphate Buffer Saline (ou PBS) ou de HANKS Balanced Saline Solution (ou HANKS BSS). Le soluté est disponible sous forme de comprimé à reconstituer dans un litre d'eau distillée. Ensuite, il faudra stériliser cette solution (pH = 7,2 - 7,4) par filtration. Ces solutions servent à laver les menus fragments d'organes comme les reins ou les testicules et à préparer des solutions enzymatiques.

1.3.2 Les milieux nutritifs.

Il s'agit du milieu de EAGLE modifié par GLASGOW (ou MEMG) que l'on trouve sous forme lyophilisée dans le commerce. Il est dissout dans de l'eau distillée puis stérilisé par filtration (pH = 7,2 - 7,4). Cette préparation est riche en éléments nutritifs indispensables à la croissance des cellules. Elle contient des vitamines, du sucre, des acides aminés, des sels minéraux etc. Cependant, ce milieu synthétique ne suffit pas à lui seul à faire démarrer une culture de cellules. Il est recommandé d'ajouter une substance naturelle comme le sérum de veau fœtal qui est riche en facteurs de croissance permettant à la cellule de s'accrocher au support avant de commencer à se diviser.

Dans cette expérience, une solution de MEMG à 10% de sérum de veau foetal et 1% d'antibiotiques est utilisée pour la culture des cellules.

Des solutions salines tamponnées de P.B.S ou de HANKS B.S.S auxquelles on ajoute de l'enzyme comme de la trypsine à des concentrations différentes, sont dites solutions tampons de trypsine. Elles sont de deux types :

- La trypsine versène est une solution de P.B.S à laquelle on ajoute de la trypsine à 1⁰/₀₀ et du versénate à 0,5⁰/₀₀. Elle est surtout utilisée pour dissocier le tapis cellulaire d'un flacon de culture. Elle permet d'effectuer des passages de cellules pour avoir des cultures dites secondaires.

- La trypsine HANKS B.S.S. (HANKS balanced salt solution) est une solution de HANKS B.S.S à laquelle on ajoute de la trypsine à 3⁰/₀₀. On l'utilise pour dissocier les fragments d'organe en unités cellulaires.

1.4. Les antibiotiques et antifongiques

Ces substances permettent d'éviter les contaminations fréquentes en culture de cellules. Il s'agit d'antibactériens comme la pénicilline souvent utilisée à la concentration 100 ui/ml et la streptomycine à 50 µg/ml.

Quant aux antifongiques, on utilise principalement la fungizone à 5 µg/ml qui inhibe la prolifération et l'action des champignons.

1.5. Matériels de laboratoire

- Boîte à instruments stérile contenant : 2 paires de ciseaux droits, 2 pinces à dents de souris, 2 lames de bistouris montées sur une tige métallique, une cuillère à café,
 - des gants,
 - des boîtes de pétri stériles,
 - des boîtes de culture de 75 cm²,
 - de l'alcool à 90° ,
 - des pipettes de 2 ml, 5 ml, 10 ml,
 - un entonnoir muni de gaze stérile (3 ou 4 épaisseurs de gaze),
 - un erlenmeyer stérile et un autre contenant un barreau aimanté,
 - un agitateur magnétique,
 - les tubes de centrifugation stériles,
 - un récipient de vidange,

- flacons de 5 ml,
- des lames de verre à une extrémité dépolie pour le test d'immunofluorescence,
- des lamelles,
- un grattoir en caoutchouc,
- une hotte à flux laminaire,
- une étuve à CO₂ à 37°C,
- une centrifugeuse réfrigérée,
- un bain marie à 37°C,
- un microscope inversé muni d'un dispositif à fluorescence,
- un bec bunsen.

2. Méthodes

2.1. Technique de culture de reins de mouton

2.1.1 Prélèvement des reins.

L'utérus (Fig. 7), nettoyé avec une solution d'alcool à 90°, est ouvert avec des ciseaux. Le foetus (Fig. 8) est prélevé puis transféré sur un plateau. Le foetus est saigné. Le flanc est désinfecté à l'endroit où il faut faire une incision pour accéder aux reins. Les deux reins sont prélevés stérilement et sont recueillis dans une boîte de pétri (Fig. 9).

2.1.2 Dissection du rein.

Elle est réalisée sous la hotte à l'aide de bistouri, de pince et de ciseaux. Les reins sont dégagés de leur capsule recouverte de tissu adipeux et sont placés dans une boîte de pétri stérile (Fig. 10). Le cortex rénal est séparé par grattage avec le bistouri en prenant soin de ne pas entraîner les masses médullaires indésirables. Les fragments de cortex sont découpés en menus morceaux à l'aide de ciseaux. Ces morceaux du cortex rénal sont transférés dans un erlenmeyer muni de barreau aimanté.



Figure 7 : L'utérus contenant l'embryon



Figure 8 : Fœtus de 14 semaines

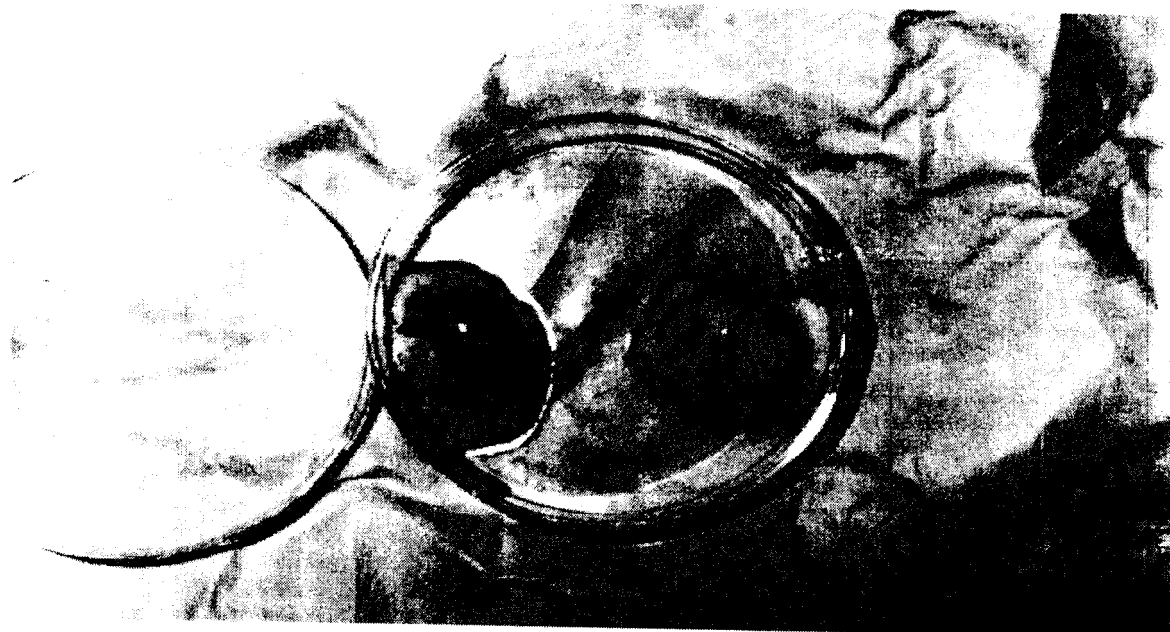


Figure 9 : Reins fraîchement prélevés.

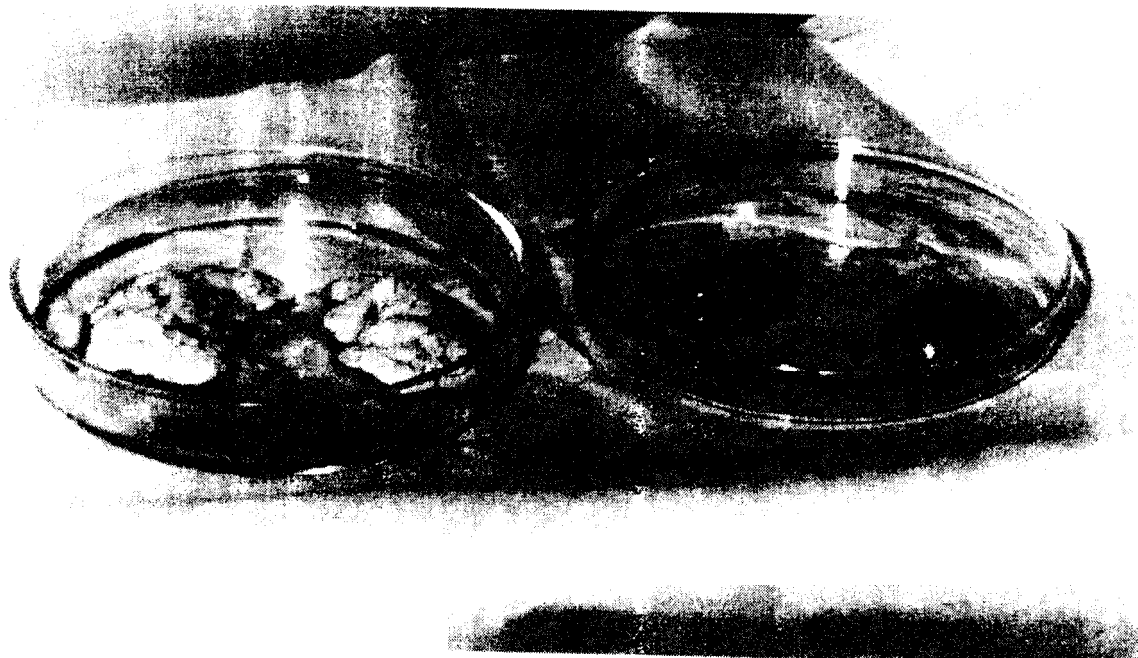


Figure 10 : Reins décapsulés.

2.1.3 Trypsination du cortex rénal

Les morceaux de cortex sont lavés trois fois avec une solution de tampon PBS. Le procédé est le suivant : les fragments des deux reins sont repris dans un volume de 150 à 200 ml de solution de P.B.S dans l'erenmeyer et, après une légère agitation, sont laissés décanter au fond du récipient pour que le surnageant puisse être éliminé. Au bout de trois lavages, le surnageant devient clair et limpide (sans trace de sang) et les fragments de cortex sont considérés propres.

Ensuite, Le dernier liquide de rinçage est remplacé par une solution d'enzyme : la trypsine HANKS BSS. L'erenmeyer, avec les fragments de cortex rénal est déposé sur l'agitateur magnétique pendant 45 à 60 mn. Au bout de cette période, les fragments sont digérés et la solution devient alors trouble. Cette solution, filtrée avec de la gaze, est recueillie dans un erlenmeyer. Le digestat filtré est réparti dans des tubes et centrifugé pendant 5 à 10 mn à 2500 t/mn à 18°C (Fig. 11).

Le culot de centrifugation contenant les cellules est repris dans une solution de milieu MEMG enrichi avec 10% de sérum de veau et 1% d'inhibiteurs que sont les antibiotiques et les antifongiques.

La concentration cellulaire de la suspension est déterminée par un comptage à l'aide de la cellule de Thoma en utilisant la formule suivante : $N = n/2 \times 10000 \times 10$ où :

- N est le total nombre de cellules/ml,
- n est le nombre de cellules comptées dans les deux chambres,
- 2 est le coefficient de division pour obtenir la moyenne des cellules comptées dans les deux compartiments de l'hémacytomètre,
- 10000 est la constante de la chambre de comptage et ramène le nombre de cellules comptées à un volume égal à 1 ml,
- 10 est le facteur de dilution

Ce comptage est nécessaire pour déterminer la concentration cellulaire convenable pour un bon développement des cellules lorsqu'elles seront mises en culture.

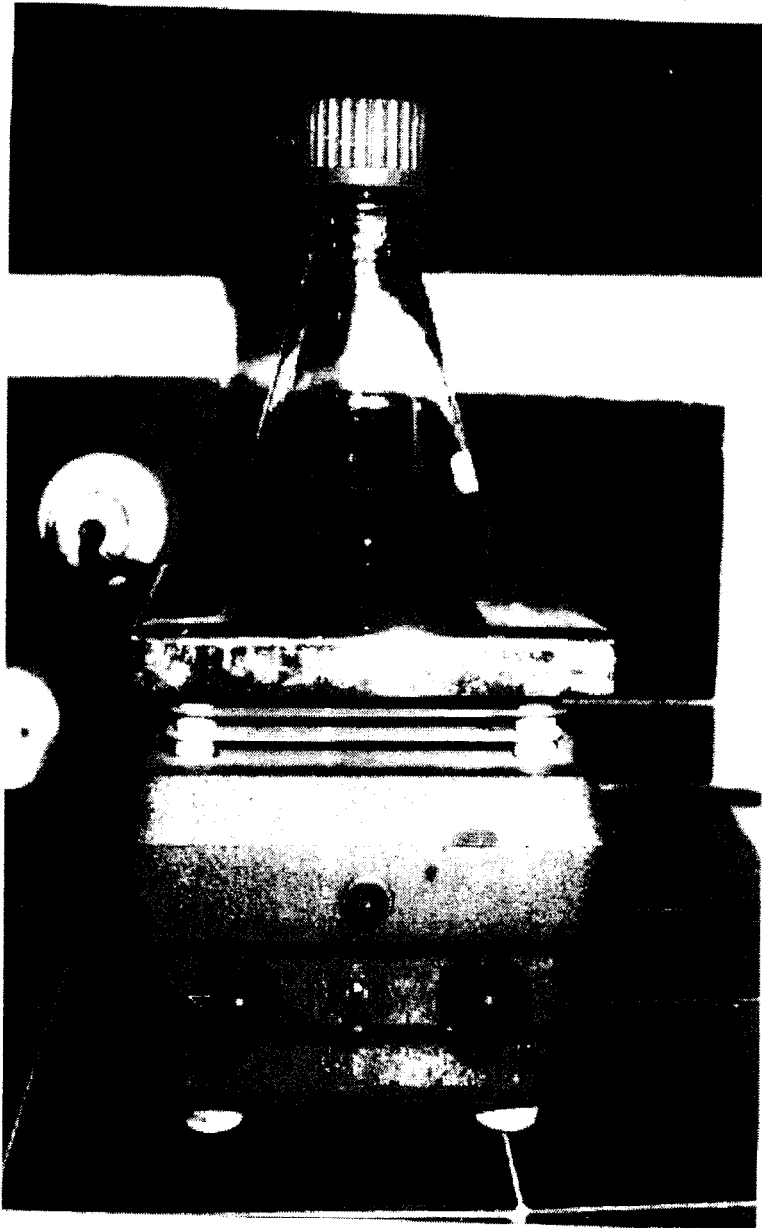


Figure 11 : Ttrypsination à température ambiante du cortex rénal.

2. 1. 4 Entretien des cellules.

Une fois ensemencées, les cellules sont examinées tous les jours. Le développement du tapis cellulaire se traduit par une modification du milieu de culture.

En effet, Il est souvent nécessaire de changer le milieu lorsqu'il devient acide (apparition d'une coloration jaune orangé) et ce, jusqu'à ce que le tapis cellulaire devienne complet ou confluent. A ce stade, toute la surface de culture du flacon est occupée par les cellules en une couche continue d'une seule assise (dite parfois couche monocellulaire). La croissance des cellules est très variable et dépend, entre autres facteurs, de la qualité des prélèvements et des milieux de culture, surtout la valeur du sérum de veau.

Lorsque le flacon de culture est complet, on peut avoir intérêt à les repiquer pour constituer des cultures secondaires ou subcultures. Cette opération s'effectue en décollant les cellules par la trypsine, en les remettant en suspension dans du milieu neuf et en les ensemencant de nouveau dans d'autres flacons. La technique utilisée est la suivante : le milieu surnageant la culture confluent est éliminé, de la trypsine, à raison de 2 ml par flacon de culture, est étalée sur les cellules et est laissée en contact pendant 30 secondes avant d'être éliminée. Pour une deuxième fois, la trypsine est étalée sur le tapis cellulaire pendant 30 à 60 secondes. Au bout de ce temps, une partie de la trypsine est éliminée. Le flacon est placé à 37°C pendant 3 à 5 mn, le restant de la trypsine continuant à agir. Les cellules se décollent facilement et sont reprises, avec soin, dans du milieu de culture neuf. La dispersion des cellules est favorisée par des aspirations et des refoulements successifs du milieu de culture avec une pipette stérile. Lorsque la culture est satisfaisante, avec un flacon de cellules confluentes, on peut préparer deux du même type.

On replace les deux flacons à 37°C après avoir inscrit sur le flacon le numéro de passage de ces cellules et la date de manipulation. Ce chiffre augmente d'une unité après chaque subculture, passage ou trypsination. Puisqu'il s'agit de cellules de première explantation, la multiplication des cellules en culture est volontairement limitée à 2 ou 3 passages.

2.1.5 Conservation des cellules.

Il est très utile pour éviter de perdre les cellules, de les conserver. Elles peuvent être conservées de deux manières :

a/ Une conservation par ralentissement du métabolisme.

Elle est obtenue en remplaçant la solution de MEMG à 10% de sérum par du MEMG à 5 ou 2% de sérum. Ou bien, les flacons de culture confluente sont retirés de l'étuve à 37°C pour être placés à la température ambiante (30°C) dans un endroit obscur ou dans une armoire à basse température (18°C). Par ces techniques, le métabolisme cellulaire est ralenti et les cellules sont conservées en l'état pendant quelques jours.

b/ Une conservation par congélation ou cryoconservation.

Ceci est possible en plaçant les cellules à des températures inférieures à -70°C. La technique de cryoconservation que nous avons utilisée met en jeu des cellules qui sont en phase exponentielle de croissance, il s'agit généralement de cultures de cellules de 24 à 48 heures. Les cultures sont trypsinées, comme pour les passages ou les subcultures. Les cellules dissociées sont centrifugées pendant 10 mn à 2000 tours par minute, Elles font l'objet d'un comptage et sont ajustées à la concentration 1,5 à 2 millions de cellules par ml dans un milieu constitué de : MEMG (69%), sérum de veau foetal (20%), Diméthylsulfoxyde (10%), Péni-streptomycine (1%). Puis, cette suspension est répartie dans des cryotubes à raison de 1 ml par tube que l'on garde successivement dans un congélateur à -20°C (pendant 3 h), puis dans un congélateur à -70°C où elles pourront rester pendant 6 mois. Cette durée de conservation peut être de plusieurs années lorsque les cellules sont gardées dans de l'azote liquide (-196°C). Donc, il est possible, par cette cryoconservation, d'éviter d'avoir le souci permanent de l'entretien des cultures cellulaires.

2.2. Technique de culture de testicules de mouton

Les testicules sont prélevés aseptiquement et recueillis dans une boîte de pétri stérile. Ils sont ensuite décapsulés à l'aide de pinces et de ciseaux, puis découpés en menus morceaux.

Le hachis est repris avec une solution de MEMG t 10% de sérum de veau foetal t 1% d'inhibiteurs. Cette suspension de tissus est transférée dans un flacon de culture qui est placé à l'étuve à 37°C, pendant au moins 72 h. Au cours de cette période, les cultures présentant des contaminations indésirables (bactérienne ou fongique) sont écartées, au contraire celles avec un développement cellulaire vont servir aux études virologiques, notamment les isollements et les identifications.

2.3. Technique d'inoculation des cellules

La majorité des virus pathogènes se multiplient dans quelques cellules. Pour chaque virus, il est nécessaire de déterminer les conditions optimales de réplication qui sont entre autres, la période qui s'écoule entre la période d'inoculation et la présence des modifications cellulaires.

Pour le virus de la DNCB, l'existence de l'infection spécifique est étudiée par l'inoculation de culture de cellules primaires de mouton.

Cette technique d'inoculation est appliquée aussi bien aux cellules rénales qu'aux cellules testiculaires. Elle suit le processus suivant :

2.3.1 Dilution de la souche virale.

La dilution virale est utilisée aux quatre dilutions qui sont : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} . Ces dilutions sont réalisées avec le milieu de culture MEMG. Le milieu, servant de diluant, est réparti dans quatre tubes, à raison de 1,8 ml par tube. Chaque tube correspond à une dilution. Dans le premier tube, 0,2 ml de la souche virale est ajouté pour obtenir la dilution 10^{-1} . Avec une pipette stérile, la suspension est bien homogénéisée.

De ce premier tube, on prélève 0,2 ml que l'on transfère dans le deuxième tube pour obtenir la dilution 10^{-2} . Après chaque dilution, on prend le soin de changer de pipette et de bien mélanger.

La dilution 10^{-3} est obtenue dans le troisième tube qui reçoit 0,2 ml du deuxième tube. Et enfin, le quatrième tube correspond à la dilution 10^{-4} .

Les opérations de dilution de l'inoculum viral sont réalisées dans de la glace fondante, c'est à dire à la température de 0°C.

2.3.2 Infection des cellules.

L'infection des cellules est réalisée avec l'inoculum viral. Des flacons de culture de cellules confluentes (de rein et de testicule) sont choisis. Pour chaque type de cellules, deux flacons seront utilisés : un flacon recevra l'inoculum viral et le deuxième flacon est considéré comme témoin négatif c'est à dire ne recevant pas d'inoculum viral.

Pour l'inoculation des cellules proprement dite, on procède ainsi : les flacons de culture sont vidés de leur milieu de culture et sont égouttés très soigneusement. On met sur les cellules par 1 ml de suspension virale à la dilution 10^{-4} . Il est nécessaire de bien étaler l'inoculum sur les cellules. Cet inoculum est laissé en contact avec les cellules pendant une heure à 37°C , temps nécessaire pour que les particules virales s'adsorbent sur les cellules.

Au bout de cette période, l'inoculum est éliminé et est remplacé par 10 ml de MEMG à 5% de sérum de veau. Ce milieu à 5% de sérum de veau est dit milieu d'entretien contrairement au milieu à 10% de sérum de veau ou milieu de croissance. Ces flacons inoculés ainsi que les flacons témoins sont placés à l'étuve à 37°C .

Dès le lendemain, on vérifie que les flacons ne sont pas contaminés par des bactéries ou champignons. Les flacons présentant une croissance bactérienne ou fongique sont éliminés. Au contraire, les flacons de culture non contaminés sont remis à l'étuve jusqu'au quatrième jour à partir duquel l'examen des boîtes devient quotidien.

De plus, des prélèvements de 0,5 ml du milieu surnageant les cultures sont effectués et gardés à la température de -20°C . Ces prélèvements doivent permettre de déterminer l'évolution dans le temps de la production de virus par les cellules infectées.

2.4. Méthodes d'identification du virus de la DNCB et titrage

La plupart des virus provoque des modifications cellulaires variées, et généralement spécifiques : ce sont les effets cytopathogènes. Ceux-ci sont consécutifs à l'invasion du virus dans la cellule hôte où il se multiplie à ses dépens.

Il provoque des altérations cellulaires de plus en plus importantes au fil du temps qui conduisent finalement à la mort de la cellule. Ces lésions cytopathiques sont facilement décelables par simple examen optique des cellules à l'état frais et après coloration.

Cependant, d'autres virus provoquent des modifications intracellulaires, qui ne sont pas apparentes au microscope optique malgré une activité effective du virus dans la cellule.

Dans ce cas, on utilise des méthodes indirectes de détection telles que : la technique d'utilisation des anticorps fluorescents (ATANASIU, 1976). Ces derniers se fixent sur l'antigène viral et le complexe formé pourra être révélé grâce à la fluorescence visible au microscope à ultraviolet. C'est cette technique que nous avons utilisée pour confirmer l'examen des lésions spécifiques.

2.4.1 Observation de l'effet cytopathogène (ECP)

Les lésions cytopathiques sont facilement décelables avec ou sans coloration.

a/ Examen à l'état frais : il faut toujours se référer aux témoins pour noter les éventuels changements cytologiques. L'observation des effets cytopathogènes au microscope est poursuivie jusqu'à la destruction quasi - complète du tapis cellulaire.

b/ Examen après coloration au Giemsa : cette technique présente les étapes suivantes :

la fixation.

Pour fixer les cellules, on enlève le milieu de culture. On lave une fois à l'eau physiologique et on met le méthanol de manière à bien recouvrir les cellules. La fixation est rapide car 3 à 5 minutes suffisent.

la coloration.

On utilise la solution de Giemsa suivante : 1 ml de Giemsa pour 14 ml d'eau distillée. On recouvre la culture de ce colorant et on laisse agir pendant 20 mn. Au bout de ce temps d'incubation, on élimine l'excès de colorant puis on rince la culture à l'eau distillée.

On déshydrate pendant 15 secondes en plongeant la plaque dans un bain d'acétone puis pendant 15 secondes dans un bain de toluène. On laisse sécher avant d'observer au microscope optique.

2.4.2 Fixation des anticorps fluorescents.

Le principe consiste à déterminer la présence d'un antigène dans une cellule au moyen d'anticorps spécifiques rendus visibles à la lumière ultraviolette, par couplage avec une substance fluorescente (isothiocyanate de fluorescéine).

La technique d'immunofluorescence indirecte utilisée est la suivante : deux flacons de cellules rénales et deux de cellules testiculaires (flacon inoculé et un témoin) sont utilisés, les milieux de culture sont éliminés. Avec le grattoir en caoutchouc, on racle une petite zone du tapis de cellules. Ces cellules grattées sont reprises dans un tube contenant 1 ml d'eau distillée. Elles sont déposées en "spot" sur des lames porte-objet à raison de 10 μ l de suspension cellulaire par spot (Fig. 12). On met des cellules saines sur la première ligne et sur la deuxième ligne des cellules infectées. On laisse sécher sous la hotte avant de fixer à l'acétone pendant 10 mn à 4°C. Les lames sont séchées à nouveau, puis on met les sérums dilués au 1/20^{ème} dans du PBS. En effet, on dispose d'un sérum positif en anticorps provenant d'un animal malade (sérum positif) et d'un sérum de veau foetal (sérum négatif) Une goutte de sérum positif est déposée dans le premier trou et une du sérum négatif dans le deuxième trou et ainsi de suite. On incube pendant 40 mn à 37°C avant de laver 2 fois pendant 10 mn avec du PBS.

Une goutte de conjugué (anti-sérum) est déposée dans chaque trou, le conjugué est utilisé aux dilutions suivantes : 1/10, 1/20, 1/40, 1/100.

L'incubation se fait pendant 40 mn à 37°C dans une chambre humide puis on lave 2 fois pendant 10 mn avec du PBS. Le rinçage se fait à l'eau distillée et on laisse sécher à l'air.

Lorsque la lame est sèche, on dépose une goutte de glycérine tamponnée sur chaque trou avant de recouvrir d'une lamelle.

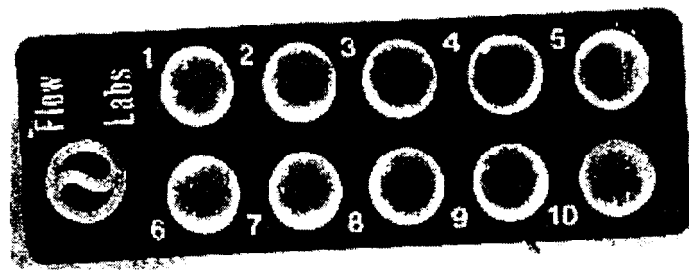


Figure 12 : Lame porte-objet pour immunofluorescence

Enfin, la lecture se fait grâce à un microscope à fluorescence dans une chambre noire.

2.4.3 Titrage du virus de la D.N.C.B. dans les différentes récoltes.

Le titrage d'une suspension de virus est une évaluation du nombre de particules virales susceptibles de provoquer une manifestation déterminée chez un hôte sensible. Pour atteindre ce résultat, la suspension à titrer est diluée suivant une progression géométrique et on inocule un groupe d'hôtes pour chaque dilution. Le choix du facteur de dilution dépend du système virus - hôte étudié et des conditions de travail. Dans notre expérience, des dilutions logarithmiques (facteur de dilution = 10) sont utilisées, l'hôte est une culture cellulaire et le phénomène qui représente la réponse à l'action du virus est l'effet cytopathogène.

Il existe plusieurs sortes de titrages : la méthode des plages, le titrage en tube (macrométhode) et le titrage sur plaque (microméthode). C'est cette dernière technique que nous utiliserons dans notre étude. Elle présente l'avantage d'être beaucoup plus sensible que les autres méthodes.

Les plaques utilisées sont de matière plastique traitée portant 96 godets (8 x12) à fond plat circulaire de 7 mm de diamètre,. Elles sont munies d'un couvercle non étanche.

Une étuve pour gazage en mélange air - CO₂ (95% et 5% respectivement) est donc indispensable pour la culture dans les plaques de ce type.

Exécution de la réaction :

D'abord une dilution de 10 en 10 allant de 10⁻¹ à 10⁻⁷ est effectuée sur la récolte du premier jour. La dilution 10⁻¹ est distribuée dans les 8 godets de la première ligne de la plaque (à raison de 100 µl par godet), ensuite la dilution 10⁻² dans la deuxième ligne et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10⁻⁷ (Fig. 13).

Les deux dernières lignes de godets de la plaque sont des témoin - cellules donc au lieu de mettre une suspension virale, on ne mettra que 100 µl de diluant (M.EM.G).

Dilutions virales							Témoins-cellules					
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}						
↓						↓					↓	↓
↓						↓					↓	↓
↓						↓					↓	↓
↓						↓					↓	↓
↓						↓					↓	↓
↓						↓					↓	↓
↓						↓					↓	↓
↓						↓					↓	↓

Figure 13 : Schéma d'une plaque de titrage

Puis, on distribue sur la plaque les cellules en suspension dans du milieu nutritif (M.E.M.G à 10% de sérum de veau) toujours à raison de 100 µl par godet. La suspension cellulaire utilisée a une concentration cellulaire = 150000 cellules/ ml.

Pour chaque récolte, le titrage s'effectuera sur les deux types de cellules étudiées (rein et testicule) qui sont de la même origine et de la même génération. Les mêmes procédés de dilution et de distribution sont répétés pour les récoltes des 2^{ème} au 10^{ème} jours.

Toutes les plaques sont ensuite gardées à l'étuve à CO₂, après les avoir identifiées correctement en marquant sur la plaque le jour de récolte et le type de cellules utilisées.

Il est nécessaire de surveiller l'acidification de la culture les jours suivants pour l'ajuster au besoin. La lecture des plaques se fait après une durée d'incubation arbitraire de 4 jours habituellement et doit être poursuivie jusqu'au 10^{ème} jour.

2.4.4 Calcul de la dose infectante 50% (DI 50% ou DICT 50).

Le calcul peut se faire de deux façons :

- soit en utilisant la méthode de REED et MUENCH qui a pour but d'améliorer par un artifice de calcul, l'alignement de points expérimentaux qui se trouvent répartis symétriquement de part et d'autre du point 50%. Puis, de calculer la DI 50% par interpolation entre l'échelle des dilutions et l'échelle des pourcentages. Cette méthode est basée sur le principe suivant : tout hôte atteint à une dilution donnée, aurait obligatoirement été atteint à une dilution plus forte et inversement, tout hôte indemne à une dilution donnée, l'aurait été à fortiori à une dilution plus faible. Ce raisonnement implique évidemment l'existence d'un "seuil " individuel. La faiblesse de cette méthode réside donc sur le cumul des réponses qui ne se justifie nullement dans le cas de titrage en cultures cellulaires, où la réponse de l'hôte ne dépend que de la présence ou non d'unités infectieuses.
- soit par la méthode de SPEERMANN - KARBER. Les points expérimentaux doivent s'échelonner entre 0 et 100% et avoir une distribution à peu près symétrique.

Le calcul du titre se fait grâce à la formule statistique suivante : $t = X_0 + d (P - 0,5)$
où :

t = log dose d'effet cytopathogène 50% (DICT50) par volume d'inoculation

X_0 = log de la dernière dilution donnant 100% de positifs (E. C. P.)

d = échelle logarithmique de dilution (ici, $d = 1$ car dilution de 10 en 10)

P = somme des proportions des positifs à partir de la dernière dilution (inclusive) donnant 100% de positifs.

Le titre du virus rapporté à un volume de 1 ml est : $T = 10^{f+t}$ DICT50 / ml, où,

f = log du facteur de X pour avoir 1 ml; il est égal à 1 (log 10) dans le cas de cette étude, puisque 100 μ l de suspension virale sont utilisés comme volume d'infection

2.4.5 Application du test U de **MANN** et **WHITHNEY**

Ce test a pour objectif de comparer 2 échantillons d'une variable quantitative sans rien supposer des lois de probabilité de la variable dans ces échantillons. On procède comme suit : d'abord on classe les titres de la série "testicules" (X) et celles de la série "reins" (Y) du plus petit au plus grand. Ensuite on compte pour chaque "X" le nombre de "Y" qui lui sont inférieurs et on les additionne. La somme est notée U_1 pour les "X" et U_2 pour les "Y". La plus petite valeur entre U_1 et U_2 sera notée U . Elle sera comparée à U_{α} que l'on lira sur la table (annexe), si $U > U_{\alpha}$ au seuil fixé (5%) on en conclura que la différence de sensibilité entre les deux types de cellules n'est pas très significative. Dans le cas où $U < U_{\alpha}$ alors on pourra en déduire que la différence de sensibilité est assez significative.

RESULTATS

1. Evolution des tapis cellulaires non infectés

Du fait de la similitude des stades 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} jours d'une part et 5^{ème} au 7^{ème} jours d'autre part les lectures sont faites aux 1^{er}, 4^{ème} et 7^{ème} jours.

1.1 Observation des cellules rénales.

Au premier jour, les cellules individualisées sont arrondies et ont tendance à tomber au fond du support. Par endroits, on a des fragments de tissus qui correspondent à des néphrons. L'ensemencement d'environ 175000 cellules/ml permet d'avoir un tapis confluent sans que les cellules n'aient trop à s'étirer pour occuper toute la surface.

Au quatrième jour, les cellules prolifèrent et tendent à s'assembler pour occuper toute la surface du support. Le tapis cellulaire naissant forme alors un épithélium simple. Quelques rares foyers de cellules fibroblastiques sont observés. Puisque la mitose dure en moyenne 2 h, il apparaît très vite des densités importantes de cellules qui croissent de façon exponentielle. Néanmoins, les cellules forment toujours une culture en monocouche.

Au septième jour, le tapis cellulaire est pratiquement complet avec de nombreuses cellules épithéliales et quelques cellules fibroblastiques. Toute la surface du support est maintenant recouverte de cellules. Le tapis est très confluent avec des cellules jointives. La croissance des cellules semble arrêtée (Fig. 14 et 15).

1.2 Observation des cellules de testicules

Au premier jour, les fragments de tissus baignent dans un mince film de milieu. Il n'y a pas de cellules individualisées mais plutôt des amas initiaux de cellules.

Au quatrième jour, on voit des cellules d'apparence épithéliale qui rayonnent autour des fragments. Ces derniers s'étant adsorbés au support, initient la prolifération cellulaire. On commence à voir des cellules bien définies qui se sont détachées du tissu originel.

Au septième jour, la boîte est confluyente à 80%. Il apparaît deux types de cellules associés aux fragments initiaux.

Certaines cellules sont allongées et s'organisent en faisceaux. D'autres sont cubiques et se disposent en couches concentriques autour des faisceaux.

2. Evolution des tapis de cellules infectées

2.1 Observation de l'effet cytopathogène (ECP)

Nous avons observé des cellules rénales et testiculaires à l'état frais et après coloration.

Pour les cellules rénales à l'état frais, au quatrième jour, il y a par endroits des cellules plus grosses et arrondies qui sont réfringentes. Elles semblent se détacher du reste du tapis comportant des cellules plus petites. La boîte témoin ne présente aucune modification cytologique.

Après coloration, quelques inclusions acidophiles sont colorées en rouge dans la portion cytoplasmique de la cellule. Ces rares inclusions colorées n'existent pas dans la boîte témoin (Fig. 16 et 17).

Au septième jour, on a des foyers de lésion sur presque toute la surface. La cellule n'éclate pas encore, elle finit par se recroqueviller en un amas de débris qui renferme la plus grande part des virions qu'elle a produits. Aussi, les inclusions colorées qui apparaissent dans le cytoplasme deviennent plus importantes. Leur abondance dans la cellule infectée est proportionnelle à la multiplicité d'infection. La boîte témoin reste intacte (Fig. 18).

Les cellules du testicule examinées à l'état frais, révèlent au quatrième jour un nombre relativement important de cellules réfringentes. Après coloration, les cellules de testicules infectées, comparées aux cellules témoins, présentent quelques inclusions colorées. Ces dernières s'avèrent cependant plus importantes que dans les cellules de reins.

Au septième jour, la destruction du tapis cellulaire est quasi - complète. Il n'est pas observé de cellule testiculaire intacte.

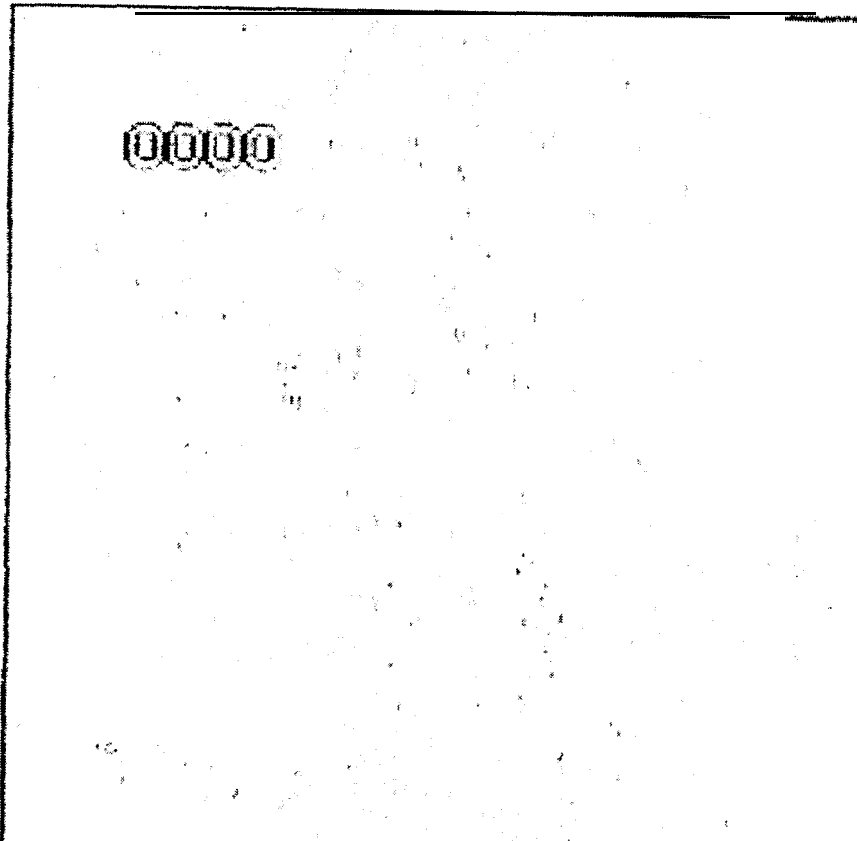


Figure 14 : Tapis complet d'une culture primaire de reins au septième jour.

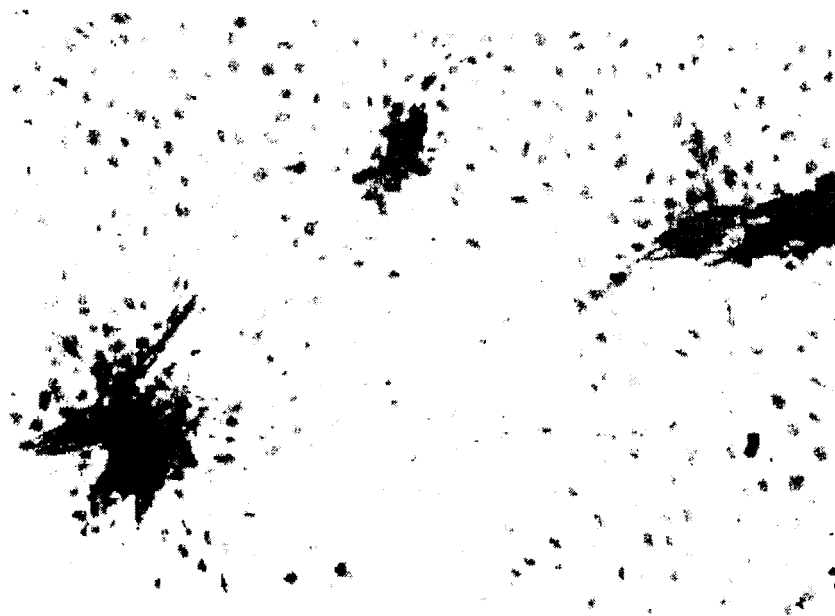


Figure 15 : Agrandissement d'une partie de la photo ci dessus, les bordures des cellules sont plus nettes . On note la présence de fragments de tissus résiduels qui forment des amas plus foncés d'où partent des cellules allongées d'allure fibroblastique.

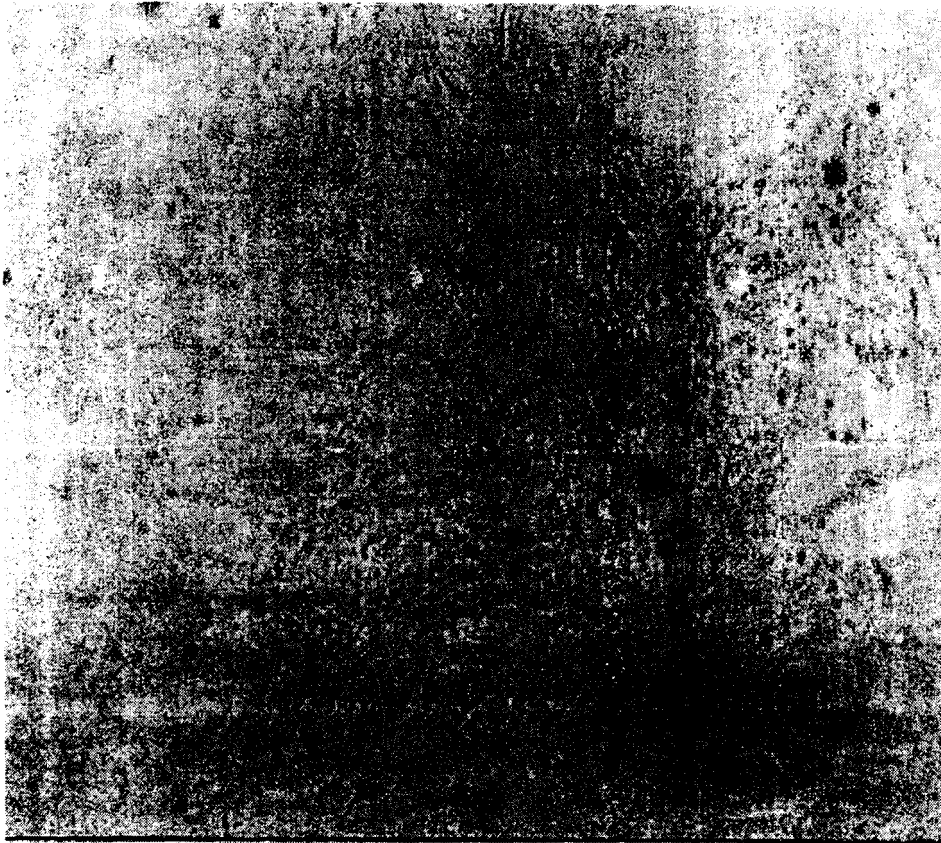


Figure 16 : Cellules rénales colorées au Giemsa après 4 jours d'infection. L'ECP est diffus avec beaucoup d'inclusions colorées dans les cellules. Le tapis commence à se dégrader.

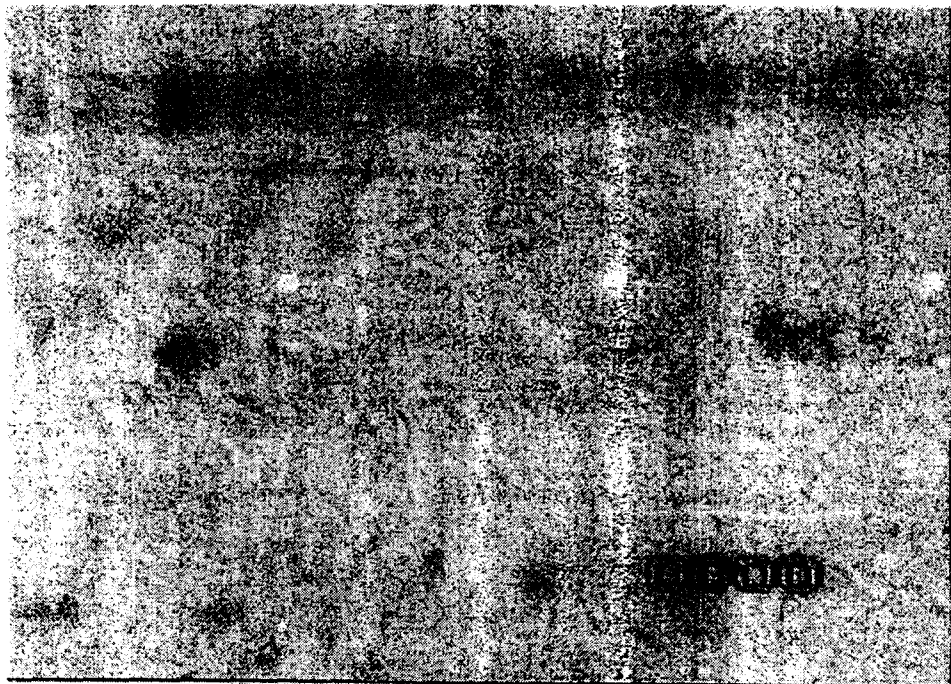


Figure 17: Cellules rénales témoins , colorées après 4 jours d'incubation sans virus. Le tapis est intact et on ne décèle aucune coloration dans les cellules.

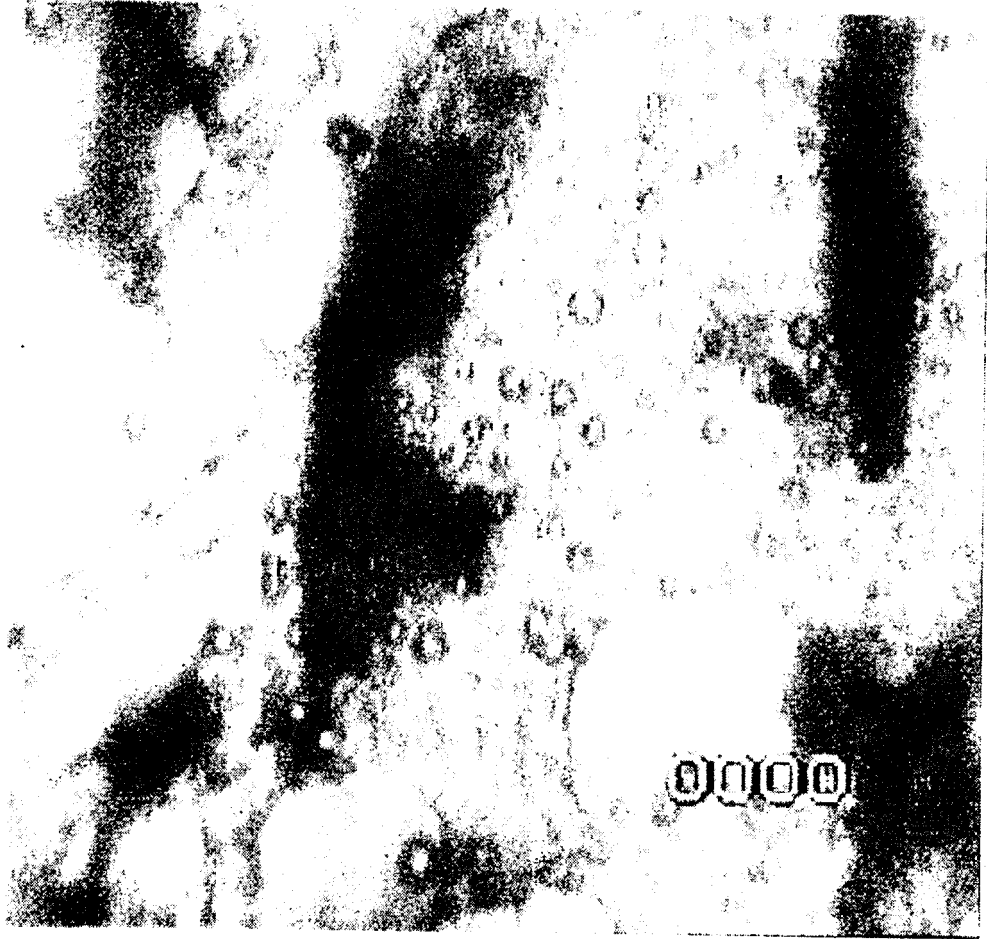


Figure 18 : Cellules rénales infectées, observées au septième jour. Les cellules semblent se détacher du tapis en s'arrondissant , la coloration dans les cellules devient plus vive.

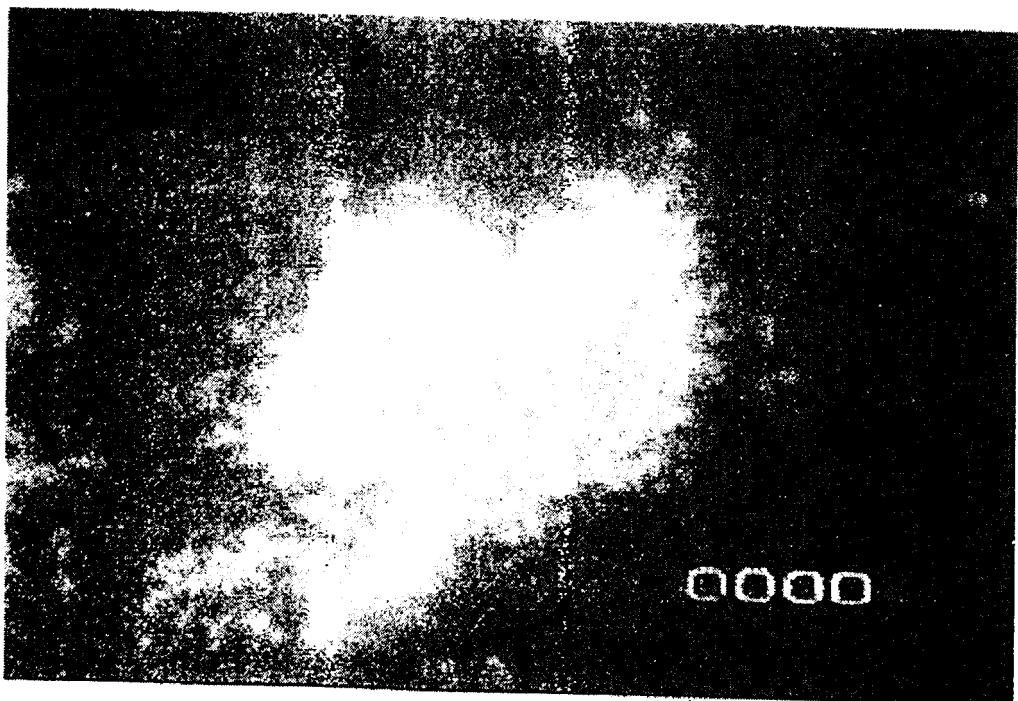


Figure 19 : Amas de cellules rénales fluorescentes au 7^{ème} jour

Les cellules de testicules se prêtent particulièrement bien à la multiplication virale, le virus se réplique efficacement avant l'autolyse de son hôte. Cela explique le grand nombre de virions visibles après coloration dans le cytoplasme de ces cellules.

2.2 Observation de la fluorescence spécifique.

Pour les cellules rénales comme pour les cellules testiculaires les résultats obtenus pour les trous témoins (cellules saines et/ou sérum négatif) ne montrent aucune fluorescence. Ceci témoigne de l'absence de réaction immunocytochimique.

Dans le cas des trous avec du sérum positif et cellules infectées, nous observons au quatrième jour une fluorescence relativement faible pour les cellules rénales. Cette fluorescence apparaît plus importante pour les cellules testiculaires.

Au septième jour, la fluorescence augmente pour les deux types cellulaires. Mais elle est toujours plus élevée pour les cellules de testicules (Fig. 19).

2.3 Lecture des plaques de titrage.

Le résultat des titrages effectués sur les récoltes des 1^{er} au 10^{ème} jours des deux types cellulaires, sont présentés dans le tableau 1.

Au niveau des prélèvements du 1^{er} jour, on observe la présence d'effet cytopathogène aussi bien pour les cellules testiculaires que pour les cellules rénales, avec des titres respectifs de $10^{3,87}$ et $10^{3,75}$ DCP50 par ml. Ces titres vont en augmentant jusqu'au 8^{ème} jour et commencent à baisser à partir du 9^{ème} jour.

La représentation graphique de ces observations (Fig. 20), décrit une superposition de deux arcs à partir du 7^{ème} jour. Du 1^{er} au 6^{ème} jour on a un léger décalage entre les deux courbes. D'une manière générale ces deux courbes ont une même cinétique.

2.4' Calcul de titre par la méthode de SPEERMANN - KARBER

Exemple du premier jour (J 1) :

cellules de testicules : $t = 2 + 1 (11/8 - 0,5) = 2,87$

$$T = 10^{1+2,87} = 10^{3,87} \text{ DICT } 50 / \text{ ml}$$

cellules de reins : $t = 2 + (10/8 - 0,5) = 2,75$

$$T = 10^{1+2,75} = 10^{3,75} \text{ DICT } 50 / \text{ ml}$$

Dans la pratique la méthode de SPEERMANN - KARBER est la plus usitée, parce que plus facile et plus rapide à calculer.

Les titres des 9 autres jours sont calculés de la même manière et sont confinés dans le tableau 1.

2.5 Test U de MANN et WHITHNEY.

Les titres calculés pour chaque jour sont ici remplacés par des classements par ordre croissant. Aussi le plus grand titre occupe la première position et ainsi de suite jusqu'à la 20^{ème} place sans tenir compte du type de cellule. Lorsqu'on a 2 fois le même titre on ajoute 0,5 au rang occupé et le nombre (rang) qui vient aussitôt après est éliminé (Tableau 2).

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
DICT (test)	3,87	4,62	5,12	5,62	5,87	6,00	6,25	6,50	6,37	6,25
DICT (rein)	3,75	4,00	4,50	4,87	5,50	5,75	6,12	6,37	6,25	6,00

Tableau 1 : Titres des récoltes en fonction du temps d'infection.

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	Total
rang de X	2	5	7	9	11	12,5	15,5	20	18,5	15,5	116
rang de Y	1	3	4	6	8	10	14	18,5	15,5	12,5	92,5

Tableau 2 : Classement des rangs de " X " et de " Y "

$n_1 = 10$ et $n_2 = 10$ (on a 10 titres pour chaque type de cellule)

alors $n = n_1 \times n_2 = 10 \times 10 = 100$

$U_1 = n + n_2 (n_2 + 1) / 2 - \text{Total (Y)} \Rightarrow$ d'où $U_1 = 100 + 10 (1 / 2) \cdot 92,5 = 62,5$

$U_2 = n + n_1 (n_1 + 1) / 2 - \text{Total (X)} \Rightarrow$ d'où $U_2 = 100 + 10 (11 / 2) - 116 = 39$

U étant le plus petit entre U_1 et U_2 (39), $U_{1\alpha}$ (23) : étant celle qui est donnée par la table jointe en annexe. U est donc supérieur à $U_{1\alpha}$ au risque 5%.

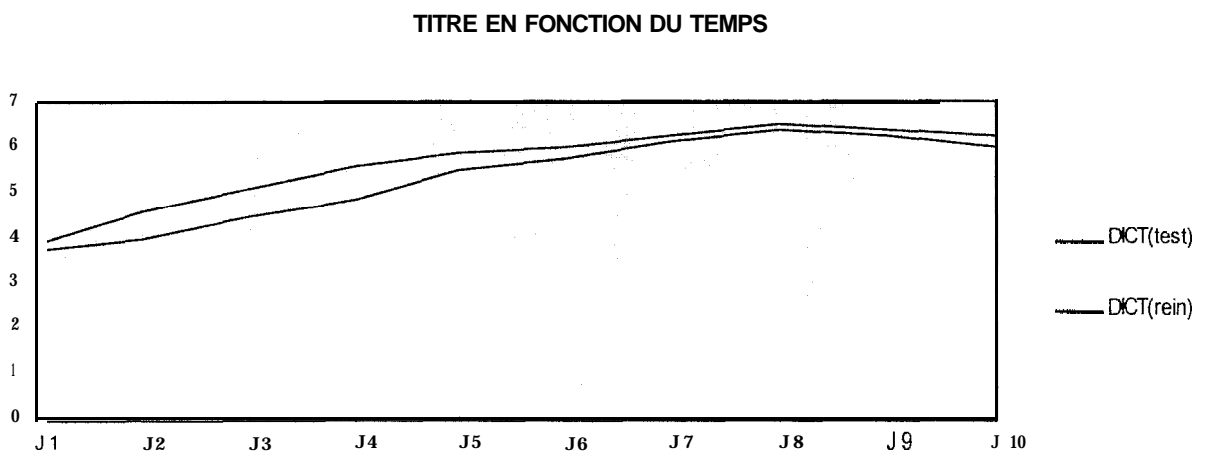


Figure 20 : Evolution du titre en fonction du temps

DISCUSSION

Cette série d'expériences nous a permis de suivre l'évolution de la cellule vivante en culture *in vitro*.

1. Caractères des cellules non infectées :

Ces deux systèmes cellulaires nous permettent d'apprécier l'une et l'autre des méthodes de mise en culture.

En effet, pour une culture de fragments de tissus comme dans le cas du testicule, il apparaît fréquemment autour des fragments cultivés, des proliférations et des migrations cellulaires moins différenciées” Cette méthode représente la transition avec les cultures cellulaires proprement dites qui offrent une plus grande homogénéité, comme dans le cas du rein. L'introduction de la trypsine dans la préparation de cultures cellulaires destinées à la virologie est due à DULBECCO (1952). Elle permet d'avoir une suspension homogène de cellules séparées. Le tapis cellulaire qui en résulte est beaucoup plus uniforme, avec la mise en oeuvre d'une plus grande quantité de cellules.

Outre la technique de mise en culture choisie, l'aspect des cellules peut changer selon les conditions et l'intensité du métabolisme. Les cellules des tissus embryonnaires qui “poussent” dans un milieu artificiel différent de celles qui existent dans l'organisme; notamment par l'utilisation d'un support solide, par l'apport d'un milieu modifié riche en facteurs de croissance contenus dans le sérum d'un animal jeune. Cependant, ces cultures sont soumises à des régulations dont on retrouve les analogues dans l'organisme. Lorsque les cellules sontensemencées, leur orientation est quelconque, mais lorsqu'elles se rencontrent elles tendent à s'orienter parallèlement l'une à l'autre. Au stade de la confluence, les cellules sont jointives et leur division s'arrête quelle que soit la richesse du milieu en métabolites. C'est le phénomène de topo-inhibition. Ensuite, on a vu que leur croissance était aussi limitée dans le temps (2 ou 3 passages). Nos résultats sont conformes à ceux décrits par MONTAGNIER (1976) qui parlait ainsi de la “régulation du comportement social des cellules”.

Il apparaît plus commode d'employer les reins qui assurent un rendement cellulaire plus important et évitent les interventions fréquentes comme les trypsinations.

En effet, les deux reins, dès leur première trypsination fournissent suffisamment de matériel cellulaire pour les opérations ultérieures de titrage, d'isolement et de production de vaccins. Alors que pour les testicules, plusieurs passages sont nécessaires pour obtenir une même quantité de cellules. Ces trypsinations fréquentes provoquent des altérations de la membrane cellulaire donc la mort de la cellule.

2. Caractères des cellules infectées :

La forme de la cellule est altérée pour les deux exemples. Elle devient plus grosse et s'arrondit. On constate également une baisse de l'adhésivité des cellules par rapport au support et des cellules entre elles. Le tapis confluent auparavant doté de cellules jointives devient plus lâche. Ceci s'explique par la phagocytose des particules virales, qui désorganise le cytosquelette. C'est ce dernier qui donne à la cellule normale sa forme caractéristique.

Il ressort de cette étude que les cellules testiculaires sont légèrement plus sensibles au virus de la DNCB que celles du rein. En effet, d'abord les différentes colorations (Giemsa et immunofluorescence) révèlent une présence toujours plus marquée de particules virales dans les cellules testiculaires par rapport aux cellules rénales. Il apparaît aussi à la lecture des titrages que le taux de virus est toujours sensiblement plus important dans les cellules de testicules. Toutefois, la similarité de l'allure des deux courbes d'évolution indique que le virus se comporterait de la même façon dans les deux types cellulaires. La virémie est maximale au 8^{ème} jour ensuite aux 9^{ème} et 10^{ème} jours, la quantité de virus circulants est dégressive. Cette observation est d'autant plus importante qu'elle témoigne encore une fois de l'état de parasite strict du virus. Lorsqu'il n'y a plus de cellules viables pour " héberger " le virus, celui-ci meurt à son tour. Ici, le tapis est totalement détruit à partir du 8^{ème} jour, d'où la baisse du titre notée aux 9 et 10^{ème} jours. Le décalage enregistré entre les deux tracés s'expliquerait par la différence de sensibilité entre les deux types cellulaires et d'après le graphique, les cellules de testicules sont plus sensibles au virus DNCB que les cellules de reins, surtout lors des premiers jours d'infection. D'ailleurs ce degré de sensibilité a pu être évalué grâce au test U de MANN ET WHITNEY qui nous a montré que la différence de sensibilité n'était pas significative entre les deux types de cellules.

Ces observations répondent à nos attentes car selon le Manuel de l'OIE (1996), les tissus testiculaires de mouton sont les plus sensibles à la DNCB, ensuite viennent les reins, puis les muscles et bien d'autres tissus épithéliaux.

La DNCB peut conduire à une infertilité temporaire ou permanente chez le mâle ce qui traduit donc une lésion des organes génitaux *in vivo*. Ce tropisme pour cet organe se retrouve même lorsqu'il s'agit de tissus testiculaires cultivés *in vitro*. Pourtant, les cellules rénales deviennent sensibles au virus après explantation et culture *in vitro*, tandis que l'organe ne semble pas affecté *in situ*. C'est une observation classique en virologie que le spectre de sensibilité des cultures vis à vis des virus est beaucoup plus large que celui des tissus ou organes dont elles dérivent. Le fait qu'une cellule insensible dans l'organisme le devienne lorsqu'on la met en culture peut s'expliquer soit par un remodellement des motifs antigéniques (démasquage de récepteurs préexistants), soit par un processus de différenciation (acquisition de récepteurs nouveaux). Cela nous amène tout naturellement à une question. Comment des cellules d'un même individu, issues d'un même oeuf avec une hérédité identique peuvent elles devenir aussi différentes les unes des autres ? C'est la différenciation cellulaire. A la suite de cette dernière, les cellules acquièrent des protéines particulières, avec une morphologie et des possibilités fonctionnelles caractéristiques. Les récepteurs des cellules testiculaires seraient donc très tôt fonctionnels *in vivo* alors que ceux des cellules rénales le deviennent *in vitro*. Il s'agirait donc pour les cellules rénales d'un démasquage de récepteurs préexistants. La mise en contact d'un virus avec une cellule sensible entraîne l'attachement des virions à la surface de la cellule par le biais d'une attraction électrostatique. Cette attraction s'établit entre les charges complémentaires de l'enveloppe virale et celles des récepteurs spécifiques de la cellule.

Les cellules rénales comme les cellules testiculaires sont permissives au virus de la DNCB mais avec une sensibilité différentielle. Cependant il serait plus avantageux d'utiliser les cellules rénales pour une production massive de virus, puisque les cultures de rein offrent plus de matériel biologique.

Souvent caractéristique d'un virus donné, l'ECP même s'il ne permet pas une détermination complète du virus, oriente l'expérimentateur quant à la nature de l'infection, en précisant le groupe de virus auquel on a à faire.

Pour une meilleure analyse des ECP il est important d'avoir des cultures témoins car, souvent les cultures d'explants sont sujets à des dégradations non spécifiques qui pourraient conduire à des interprétations erronées

Des lésions spécifiques sont observées et la coloration au Giemsa a pu révéler la présence de particules virales dans le cytoplasme des cellules. Ces inclusions sont semblables à celles qui sont décrites dans la littérature plus connues sous le nom de corps de **GUARNIERI** et que l'on confert généralement à l'activité d'un poxvirus. L'identité du virus est confirmée par la fixation élective d'anticorps anti-DNCB, couplés à un fluochrome, sur les cellules infectées. Les observations faites après chaque technique utilisée, ont conduit à des conclusions partielles mais encore incomplètes lorsqu'elles sont exploitées individuellement.

Ainsi étape après étape, on est arrivé à identifier de façon assez précise le virus de la DNCB. Néanmoins les méthodes utilisées dans ce travail ne permettent pas toujours à elles seules la détermination complète du type de virus. Souvent des épreuves sérologiques viennent corroborer ces résultats.

Mieux, avec la naissance de la microscopie électronique comme le montrait **NDIAYE (1986)**, "lorsqu'aucune donnée sérologique ne permet de rattacher un virus à un groupe donné, seul l'examen en microscopie électronique s'avère d'un apport considérable pour la classification des virus."

**RESUME ET
PERSPECTIVES**

Des cultures de premières explantations de reins et de testicules de mouton sont réalisées puis infectées par le virus de la Dermatose Nodulaire Contagieuse Bovine (DNCB).

Différentes techniques de mise en évidence des effets cytopathogènes consécutifs à l'activité du virus dans la cellule hôte ont pu être observées puis analysées.

Il ressort de cette étude que les cellules de testicules sont légèrement plus sensibles au virus de la DNCB que les cellules de reins.

Mais à ce jour, le mode de pénétration du virus dans la cellule hôte est sujet à controverses. Certains comme KIRN (1976), pensaient que seule l'attraction de charges complémentaires suffisait. Il est maintenant avancé la théorie des récepteurs spécifiques (GIRARD et HIRTH, 1985). Aussi, une étude minutieuse des mécanismes d'adsorption virale s'impose. Et cela ne peut se faire sans la microscopie électronique associée à la biologie moléculaire. Ces deux techniques permettront l'étude ultrastructurale, l'isolement et la purification des récepteurs membranaires. Des inhibiteurs spécifiques et compétitifs de ce virus pourront être utilisés à des fins thérapeutiques; aucun traitement spécifique de cette virose n'est encore disponible.

Avec l'avènement de la PCR (polymerase chain reaction), les nouvelles techniques de biologie moléculaire ont tendance à prendre le relais dans la préparation des vaccins. En 1993, ROMERO et coll ont mis au point un vaccin recombinant peste bovine - DNCB. Pourtant son utilisation reste encore balbutiante. Ce type de vaccin bivalent ne risque-t-il pas de remettre en circulation le virus de la peste bovine dans les pays où cette maladie est éradiquée?

Les avantages qu'offrent les biotechnologies sont nombreux : sensibilité exceptionnelle de la PCR, précocité du diagnostic et sa grande fiabilité. Mais il n'en demeure pas moins vrai que les principaux tests virologiques sont encore réalisés par sérologie. Les vaccins produits à partir de cellules en culture offrent toujours des résultats satisfaisants quant à la facilité d'exécution, de reproductibilité et surtout de coût.

BIBLIOGRAPHIE

ASSO J. (1964) - Applications vétérinaires des cultures cellulaires. *Ann. Inst. Pasteur*, 106-1 08.

ATANASIU P. (1976) - Applications des anticorps fluorescents à la culture de tissu en virologie. in : *Cours de techniques de cultures cellulaires de l'Inst. Pasteur*, 1-17.

BERNHARD- W. (1976) - Notions sur la structure et la fonction cellulaires. In : *Microbiologie générale. Les virus. Inst. Pasteur*, 3-27.

BRICOUT F, JOUBERT L., HURAUX J.M. (1974) - Diagnostic sero-immunologique des viroses humaines et animales, Collection technique de base. *Maloine S. A. Editeur*, 573p.

CABASSO V.J. (1967) - "An interim scheme for virus nomenclature". *American Journal of Veterinary Research*, 28, 539-548.

CAROSELLA E.D. (1995) - La danse des kinases. *Biofutur 149*, 29-34

CARREL A. (1912) - On the permanent life of tissues outside the organism. *J. Exp. Med.* 15, 516-528.

CATEIGNE G., MAURIN J. (1965) - Isolement et étude des virus dans l'oeuf embryonné et en culture de cellules. *Collection Technique de base, Editions de la Tourelle, St-Mandé*, 203 p.

CHILLAUD T. (1996) - Le système international de déclaration des maladies animales de l'OIE. *Epidém. Santé animale*, 29, 128.

CROISSANT O. (1976) - Les méthodes de microscopie électronique et leurs applications à la virologie. *Cours de techniques de base des cultures cellulaires de l'Inst. Pasteur*. 1-21 .

DAVIES F.G. (1991) - Lumpy Skin Disease. *British Veterinary Journal*, 6, 147.

DULBECCO R. (1952) - Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particules of an animal virus. in : *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38, 747-752.

FRESHNEY R. I. (1986) - Animal cell culture, A Practical Approach. IRL . Press Oxford - Washington DC, 252 p.

FRESHNEY R. I (1987) - Culture of animal cells. A manual of basic technique. 2nd edition, Alan R. Liss Inc, New-York, 397 p.

FIRKET H. (1964) - La cellule vivante. Collection "Que sais-je ?", Presses universitaires de France. 126 p.

GEERING W.A. (1984) - Lumpy Skin Disease. in : *Emergency Disease of Livestock, diseases and diagnoses*, Vol 1, FAO/UN .

GEY G.O., COFFMAN W.D., KUBICEK M.T. (1952) - Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. in : *Cancer Res.* 12, 364-365.

GIRAUD M., HIRTH L. (1985) - Virologie générale et moléculaire. doin éditeurs Paris, 486 p.

GOUBE de LAFOREST P. (1976) - Techniques de cultures organotypiques
Cours de techniques de cultures cellulaires de l'Inst. Pasteur Paris, 1-20.

HANNOUN C. (1976a) - Tissus et cellules d'origine humaine et animale.
Cours de techniques de cultures cellulaires de l'Inst. Pasteur Paris, 1-8.

HANNOUN C. (1976b) - Les étapes préliminaires de la multiplication des virus.
Microbiologie générale. Les virus, cours de l'Inst. Pasteur Paris, 85-89.

HARRISON R.G. (1907) - Observations on the living developing nerve fiber.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 4, 140-143.

HENDERSON B. (1976) - La Lumpy Skin Disease. in : *Médecine Vétérinaire 2 édition*
Vigot Frères Editeurs, 631-632.

KESSLER N. (1994) - Les cultures cellulaires en milieu sans sérum. *Biofutur 133*, le
Technoscope 3-1 8.

KIRN A. (1976) Multiplication des virus du groupe pox. *Microbiologie générale. Les*
virus, cours de l'Inst. Pasteur Paris, 143-157.

LEFEVRE P.C. (1988) - Epidémiologie de la Maladie Nodulaire Cutanée des Bovins en
Afrique. *Maladies virales des animaux en Afrique OUA/CSTR, 477-482.*

LEFEVRE P.C. (1991) - Atlas des maladies infectieuses des ruminants. *IEMVT-CIRAD*
Maisons Alfort, France , 26-27.

ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANCAISES (1992) - Les Maladies
exotiques réputées contagieuses, chaires des maladies contagieuses.

MAURIN J. (1976a) - Les cultures cellulaires et leurs applications à l'étude des virus :
principes et matériel. *Cours de fechniques de cultures cellulaires de l'Inst. Pasteur*
Paris, 1-14.

MAURIN J. (1976b) - Etude cytologique au microscope pour identification des virus.
Méthodes indirectes. *Cours de techniques de cultures cellulaires de l'Inst. Pasteur*
Paris, 1-1 7.

MONTAGNIER L. (1976) - La transformation cellulaire. *Microbiologie générale. Les*
virus, cours de l'Inst. Pasteur Paris, 213-2 18

MULLIS K.B., FERRE F., GIBBS R.A. (1994) - P.C.R. The polymerase chain reaction
Birkhäuser Boston, 458p.

NDIAYE M. (1986) - Apport de la microscopie électronique à l'identification des virus en
Afrique. *Mémoire de DEA (Université de Dakar).*

NDIAYE M. (1986) - Apport de la microscopie électronique à l'identification des virus en Afrique. Mémoire de *DEA* (Université de Dakar).

NDOE Mb. J. Y. (1988) - Contribution à l'étude de la Maladie Nodulaire Cutanée des Bovins au Cameroun. *Thèse de Doctorat vétérinaire n°32* Dakar.

NEGALEAYE Nd. (1988) - Contribution à l'étude des cuirs et peaux au Sénégal *Thèse de Doctorat vétérinaire n°38* Dakar.

OIE MANUAL (1996) - Lumpy Skin Disease, chapter 2.1.7, 93-101.

OWENS O.H., GEY M.K. et GEY G.O. (1953) - A new method for cultivation of mammalian cells suspended in agitated fluid medium. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 1, 41

REMACLE J. (Nov 1994) - Détecter les virus. *Biofutur* 139, 54-55.

ROHNER H. (1969) - Traité des maladies à virus des animaux, Tome 1 (Partie générale). *Vigot Frères Editeurs*, 859 p.

ROITT I. (1994) - Essential Immunology. Eight edition, *Blackwell Scientific Publications*, 448 p

ROMERO C. H., BARRETT T. , EVANS S. A., KITCHING R. P. , GERSHON P. D. , BOSTOCK C. & BLACK D. N. (1993) - Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. In : *Vaccine II*, 737 - 742

TOURNIER P. (1976) - Anatomie structurale et classification des virus. | *Microbiologie générale. Les virus, cours de l'Inst. Pasteur Paris*, 51-54.

THIONGANE Y., SARR J., DIOP M., DIEME Y. (1988) - Etude de la DNCB. *Rapport annuel de l'ISRA*.

THIONGANE Y., LO M.M. (1991) - Essais d'atténuation de souche de DNCB. *Rapport annuel de l'ISRA.*

WOODS J.A., HERRING J. A., NETTLETON P.F., KREUGER N., SCOTT F.M.M., REID H.W. (1996) - Isolation of bovine herpesvirus 2 (BHV2) from a case of Pseudo-Lumpy Skin Disease in the U.K. in : *Veterinary Record* 138, 113-114.

ANNEXE

TABLE DES VALEURS DE U

n_1	n_2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2								0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2
3					0	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8
4			0	1	2	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11	11	12	13	13	
5		0	1	2	3	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	17	18	19	20	
6		1	2	3	5	6	8	10	11	13	14	16	17	19	21	22	24	25	27	
7		1	3	5	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	
8	0	2	4	6	8	10	13	15	17	19	22	24	26	28	31	34	37	39	42	45
9	0	2	4	7	10	12	15	17	20	23	26	28	31	34	37	39	42	45	48	51
10	0	3	5	8	11	14	17	20	23	26	29	33	36	39	42	45	48	52	55	58
11	0	3	6	9	13	16	19	23	26	30	33	37	40	44	47	51	55	58	62	66
12	1	4	7	11	14	18	22	26	29	33	37	41	45	49	53	57	61	65	69	73
13	1	4	8	12	16	20	24	28	33	37	41	45	50	54	59	63	67	72	76	80
14	1	5	9	13	17	22	26	31	36	40	45	50	55	60	64	69	74	78	83	87
15	1	5	10	14	19	24	29	34	39	44	49	54	60	65	70	75	80	85	90	95
16	1	6	11	15	20	26	31	37	42	47	53	59	64	70	75	81	86	92	97	102
17	2	6	11	17	22	28	34	39	45	51	57	63	69	75	81	87	93	99	105	111
18	2	7	12	18	24	30	36	42	48	54	61	67	74	80	86	93	99	106	112	119
19	2	7	13	19	25	32	38	45	52	58	65	72	78	85	92	99	106	113	119	126
20	2	8	13	20	27	34	41	48	55	62	69	76	83	90	97	105	112	119	127	134

Utilisation de la table :

Calculer U_1 et U_2 (test de Mann-Whitney, p. 30).

Prendre le "U" le plus faible et le comparer à la valeur lue dans la table à la croisée de n_1 (effectif de l'échantillon 1) et de n_2 (effectif de l'échantillon 2)

Si U est plus petit que la valeur de la table, la différence est significative (au C S 95 %)

Titre : Contribution à l'étude du virus de la Dermatose Nodulaire Contagieuse Bovine sur culture de cellules primaires de mouton.

Nom du candidat : **NDEYE FATOU TALL**

Nature du Mémoire : **D.E.A. de Biologie Animale**

Jury : Président : M. M ADY NDIAYE
 Membres : MM. OMAR THIOM TH IAW
 YAYA THIONGANE
 MEÏSSA TOURE

▪ Soutenu le 28 Juin 1999 à 9h30 à l'Amphi 7

Résumé : Dans cette étude deux cultures de cellules de premières explantations (reins et testicules de mouton) sont réalisées puis infectées par le virus de la Dermatose Nodulaire Contagieuse Bovine (DNCB).

Les modifications cytologiques ou effets cytopathogènes (ECP) consécutives à cette infection sont mises en évidence par des techniques de colorations cytologique (Giemsa) et immunologique (immunofluorescence).

Le degré d'infection de ces cellules ou titre viral est déterminé grâce à la méthode de SPEERMANN - KARBER. Les courbes d'évolution des titres en fonction du temps d'infection, des deux espèces cellulaires ont montré une différence de sensibilité peu significative entre ces deux types de cellules. Ce qui a pu être confirmé par le test U de MANN et WHITHNEY.

Mots-clefs : culture de cellules, première explantation, DNCB, ECP, titre viral, sensibilité.

Titre : Contribution à l'étude du virus de la Dermatose Nodulaire Contagieuse Bovine sur culture de cellules primaires de mouton.

Nom du candidat : **NDEYE FATOU TALL**

Nature du Mémoire : **D.E.A. de Biologie Animale**

Jury	Président :	M. MADY	NDIAYE
	Membres :	MM. OMAR THOM	TH IAW
		YAYA	THIONGANE
		MEÏSSA	TOURE

- Soutenu le 28 Juin 1999 à 9h30 à l'Amphi 7

Résumé : Dans cette étude deux cultures de cellules de premières explantations (reins et testicules de mouton) sont réalisées puis infectées par le virus de la Dermatose Nodulaire Contagieuse Bovine (DNCB),

Les modifications cytologiques ou effets cytopathogènes (ECP) consécutives à cette infection sont mises en évidence par des techniques de colorations cytologique (Giemsa) et immunologique (immunofluorescence)

Le degré d'infection de ces cellules ou titre viral est déterminé grâce à la méthode de **SPEERMANN · KARBER**. Les courbes d'évolution des titres en fonction du temps d'infection, des deux espèces cellulaires ont montré une différence de sensibilité peu significative entre ces deux types de cellules Ce qui a pu être confirmé par le test U de **MANN et WHITHNEY**.

Mots-clefs : culture de cellules, première explantation, DNCB, ECP, titre viral, sensibilité,