

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



Année : 2018

N° : 319

Influence de la qualité de l'eau sur la culture de cellules « VERO » utilisées pour la production de vaccins viraux au Laboratoire Central de l'Elevage (LABOCEL) du NIGER

MEMOIRE DE MASTER

EN MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

Présenté et soutenu publiquement à l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar ; Faculté de
Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie

Le 21 /12/2018 À 9 heures

Par

ISSA Halimatou

Née le 29 MARS 1978 à Maradi (Niger)

MEMBRES DU JURY

PRESIDENT:

M. Cheikh Saad Bouh BOYE

Professeur à l'UCAD

MEMBRES :

Mme. Ndeye Coumba TOURE-KANE

Mme Halimatou DIOP-NDIAYE, MCA

M Babacar MBENGUE, MCA

DIRECTRICE DE MEMOIRE :

Mme. Rianatou BADA ALAMBEDJI

Professeur à l'EISMV de Dakar

DEDICACES

Je dédie ce travail :

- A ALLAH, Le Clément, Miséricordieux et très Miséricordieux, Pourvoyeur en toute chose.
- A mon défunt père ISSA Batoure, qui nous a quittés il y'a treize (13) ans de cela .Que la terre lui soit légère AMEN.
- A ma mère Hadjia Aichatou Abdoulaye MATANKARI pour son appui. Qu'ALLAH la gratifie de son paradis éternel.
- A Monsieur Hamidou Djibo ainsi que sa famille.
- A tous mes frères et sœurs : Souleymane, Moustapha, Ramatou, Mariama, Nafissatou.
- A mes nièces et neveux : Farida, Mousto, Bessy, Inès, Mariam ; Mohamed et Kamil.
- A mes amies sénégalais : Ouli, Mme Collé, Ibrahim, Rokhaya N'Diaye, la famille N'Diaye à Thiès.
- Au Projet de Productivité Agricole en Afrique de l'Ouest (PPAAO Niger) pour le Financement de ma formation.
- Au Professeur GOURO ainsi que sa famille.
- A mon tonton Moussa MAAZOU.
- A Monsieur Soumana ABDOULAYE pour tout le soutien et l'intérim.
- A tous les agents du LABOCEL / Niger.

REMERCIEMENTS

- Au Professeur Rianatou ALAMBEDJI pour m'avoir encadré dans la réalisation de ce travail, votre soutien est inoubliable ;
- Au PPAAO/Niger pour la bourse octroyée ;
- Au Professeur Cheikh S. BOYE pour la qualité de l'organisation du master, ainsi que sa patience ;
- Au Professeur Abdoulaye SECK, pour l'encadrement de la formation de façon remarquable, d'avoir toujours été à notre écoute, pour sa disponibilité et son indulgence ;
- Au Professeur Abdoulaye Soumana GOURO Coordonnateur du PPAAO et Secrétaire Exécutif du CNRA pour tout l'appui apporté lors de mon travail, ainsi que son soutien hors du commun ;
- A Mr DJIBO Hamidou, DRH du Ministère de l'élevage au Niger, pour m'avoir encouragé à faire ce master ;
- Au corps enseignant de l'UCAD/FMPO ;
- A toute la promotion 2013-2015 du master Microbiologie Fondamentale et Appliquée ;
- Mes remerciements vont également en direction des agents du Ministère de l'Elevage, en particulier Mr Inoussa Lawali et Abdelkader Issoufou. Merci pour tous les appuis pour l'analyse statistique des données ;
- A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

A NOS MAITRES ET JUGES

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE JURY, Monsieur Cheikh Saad Bouh BOYE, Professeur à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d’Odontologie de l’UCAD ;

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury. Votre abord facile et la spontanéité avec laquelle vous avez répondu à notre sollicitation nous ont beaucoup marqués. Votre dynamisme et vos grandes qualités scientifiques reconnues sur le plan international vous ont valu notre profond respect. Veuillez trouver ici l’expression de notre profonde gratitude.

Hommages respectueux.

A NOTRE MAITRE ET JUGE, Madame Ndeye Coumba TOURE-KANE ;

C’est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations. La clarté de votre enseignement, votre simplicité, vos qualités humaines et intellectuelles forcent l’admiration de tous. Nous retiendrons de vous, la rigueur et le sérieux en toute chose.

A NOTRE MAITRE ET JUGE, Madame Halimatou DIOP-NDIAYE, MCA ;

Malgré vos multiples occupations, vous avez accepté de juger ce travail. Votre disponibilité et vos qualités intellectuelles suscitent l’admiration. Soyez assuré de notre profond respect.

A NOTRE MAITRE ET JUGE, Monsieur Babacar MBENGUE, MCA

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Votre présence dans ce jury est l’expression de votre sérieux et de votre rigueur dans le travail. Trouvez ici notre profonde gratitude et notre reconnaissance.

A NOTRE MAITRE, DIRECTRICE DE MEMOIRE, Madame Rianatou ALAMBEDJI, Professeur à l’EISMV de Dakar ;

Vous avez accepté d’encadrer et de diriger ce travail avec rigueur scientifique, malgré vos multiples occupations. Votre modestie, votre sens de responsabilité, femme de science, vos qualités humaines et intellectuelles nous ont toujours fascinées. Au-delà de nos hommages respectueux, nous vous prions de trouver ici, honorable Maître, l’assurance de notre éternelle reconnaissance et de nos sincères remerciements.

RESUME

Une étude a été menée au Laboratoire Central de L'Elevage (LABOCEL) de Niamey du 23 Mai 2016 au 30 Décembre 2016.

Elle a pour but, d'identifier "la meilleure eau" en terme de qualité, pouvant servir à la préparation de milieux de culture, afin d'optimiser la production de vaccins sur cellules Vero.

Pour cela, des cellules Vero furent cultivées en lots séparés avec des milieux de culture préparés avec quatre (4) types d'eau différente : ER (eau du robinet) ; ED (eau minérale Dallol) ; ERD (eau du robinet distillée) ; EDD (eau minérale Dallol distillée). ER et ED sont considérés comme les échantillons d'eau n'ayant pas subi de traitement et ERD et EDD les mêmes échantillons ayant subi une distillation.

A l'issue de cette étude, nous avons obtenu, après comptage des cellules sur lame de Bauer les résultats suivants : ER : 62.500 cellules /ml ; ED : 412.000 cellules /ml ; ERD : 737.500 cellules /ml ; EDD : 700.000 cellules /ml. Le rendement en terme de croissance cellulaire est nettement plus élevé quand les différentes eaux subissent un traitement (distillation). En effet, au niveau de ER, le rendement après traitement est de presque 12 fois plus élevée ; et pour ED presque 2 fois plus élevé. Ainsi, l'amélioration de la qualité de l'eau servant à la préparation des milieux de culture au LABOCEL, devrait permettre d'augmenter le volume en termes de rendement du lot de vaccin d'au moins deux, voire trois fois ; et de réduire le temps de production.

Des recommandations ont été faites pour une amélioration de la formulation de préparation des milieux de culture.

Mots-clés : vaccin, eau, culture cellulaire, passage des cellules, cellules Vero

ABSTRACT

A study was conducted at the Central Veterinary Laboratory (LABOCEL) of Niamey from 24th June 2016 to 30th December 2016.

Its purpose is detecting "best water" in quality terms, which can be used for culture media preparation, in order to optimize vaccines production on Vero cells.

For this, Vero cells were cultured in separate batches with culture media prepared with four (4) different types of water: ER (tap water); ED (Dallol mineral water); ERD (distilled tap water); EDD (Dallol distilled mineral water). ER and ED are considered water samples that have not been treated, and ERD and EDD the same samples that were treated (distilled).

At the end of this study, we obtained following results after counting cells on Bauer's slide: ER: 62,500 cells / ml; ED: 412,000 cells / ml; ERD: 737,500 cells / ml; ESD: 700,000 cells / ml. The efficiency in terms of cell growth is significantly higher when different waters gone through treatment (distillation). Indeed, we find that for ER, efficiency after treatment is almost 12 times higher; and for ED almost 2 times higher.

Recommendations have been made to improve formulation of culture media preparation.

Keywords: vaccine, water, cell culture, cell passage, Vero cells

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ATCC** : American Type Culture Collection
- CEDEAO** : La Communauté économique des États de l'Afrique de l'Ouest
- ED** : Eau minérale Dallol
- EDD** : Eau Dallol Distillée
- EGF** : Epidermal Growth Factor
- ER** : Eau du robinet
- ERD** : Eau du robinet distillée
- FGF** : Fibroblaste Growth Factor
- INS** : Institut Nationale de la Statistique
- LABOCEL** : laboratoire central de l'élevage
- LANSPEX** : Laboratoire National de Santé Publique et d'expertise
- ME** : Ministère de l'Elevage
- NCCLS** : National Committee for Clinical Laboratory Standards
- PCR** : polymerase chain reaction
- PDGF** : Platelet Derived Growth Factor
- PIB** : Produit Intérieur Brut, : Produit Intérieur Brut
- PO** : Pression Osmotique
- REG** : Réticulum Endoplasmique Granuleux
- RO** : Osmose inverse
- SDDEL** : Stratégie de Développement Durable De L'élevage
- UEMOA** : Union économique et monétaire ouest-africaine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Fonction des organites de la cellules	8
Tableau II : Lignées cellulaires les plus utilisées dans les procédés industriels.....	9
Tableau III : Données récapitulatives des agents contaminants et de leurs propriétés	15
Tableau IV : Besoins Nutritifs des Cellules	18
Tableau V : Caractéristiques de la cellule Ver.....	20
Tableau VI : Spécifications des différents types d'eau purifiée	21
Tableau VII : Différents types de vaccins produits au LABOCEL.....	25
Tableau VIII :Méthode et milieux de culture / réactifs utilisés pour la détection des germes...30	
Tableau IX : Synthèse des résultats de l'analyse physico chimique des échantillons d'eau effectuée au LANSPEX	33
Tableau X : Résultats obtenus sur le rendement des cellules en fonction des échantillons d'eau	34

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différents types de vaccins	5
Figure 2 : Développement de différents types de vaccins	6
Figure 3 : cellule animale en 3 D	7
Figure 4 : Techniques de culture cellulaire	11
Figure 5 : cellule de Newbauer	12
Figure 6 : Évolution de la quantité d'ADN par cellule au cours d'un cycle cellulaire	14
Figure 7 : Facteurs du procédé de culture susceptibles d'influencer le comportement des cellules animales.....	16
Figure 8 : Cellules Vero cultivées en flacon de culture cellulaire	19
Figure 9 : Analyse de la variance par la méthode Anova GLM.....	32

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
PARTIE I :.....	3
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
Chapitre I : Vaccins et culture de cellules animales.....	4
1.1. Les différents types de vaccins	4
1.1.1. Vaccins vivants	4
1.1.2. Vaccins tués ou inactivés	4
1.2. Historique de la vaccination.....	5
1.2.1. L'antiquité et la variolisation	5
1.2.2. Fondement du principe de la vaccination par Jenner	5
1.2.3. Louis Pasteur et le principe de l'atténuation.....	6
1.3. Culture des cellules animales	6
1.3.1. La cellule animale	7
1.3.2. Différents types de cultures cellulaires	8
1.3.2.1. Culture d'organe	8
1.3.2.2. Culture primaire	8
1.3.2.3. Lignés cellulaires	9
1.4. Repiquage.....	9
1.4.1. Principe	10
1.4.2. Méthode	10
1.4.3. Comptage des cellules avec l' hématimètre de Bauer.....	11
1.4.3.1. Instructions chronologiques	12
1.4.3.2. Interprétation des résultats :.....	12
1.4.4. Cycle cellulaire	13
1.4.5. Contaminations microbiennes.....	14
Chapitre II : Paramètres influençant la culture cellulaire	16
2.1. La température	16
2.2. Le pH	17
2.3. Osmolalité.....	17
2.4. Tension de l'oxygène dissout	17

2.5. Milieux de culture	17
Chapitre III : Les cellules « VERO »	19
3.1. Origine et historique de la lignée cellulaire Vero	19
3.2. Caractéristiques des cellules « Vero »	20
Chapitre IV : Eau pour culture cellulaire	21
4.1. Eau de type I – NCCLS	22
4.2. Eau de type II – NCCLS	22
4.3. Eau de type III – NCCLS	22
PARTIE II :	23
Chapitre I : Matériel et méthodes	24
1.1. . Matériel	24
1.1.1. Présentation du LABOCEL	24
1.1.2. Matériel technique et biologique.....	26
Milieux, solutions et réactifs	26
1.2. Méthode d'étude.....	27
1.2.1. Méthode d'étude au LANSPEX.....	27
1.2.1.1. Analyse physico- chimique des échantillons d'eau	27
a) La spectrophotométrie	27
b) La conductimétrie	28
c) Turbidimétrie	29
d) Mesure du pH	29
1.2.1.2. Analyse microbiologique des échantillons d'eau	29
1.2.2. Méthode d'étude au LABOCEL	30
1.2.2.1. Mode Opérateur pour la multiplication des cellules	31
1.2.2.2. Procédure	31
1.2.3. Traitement statistique des données	31
CHAPITRE II : RESULTATS.....	32
2.1. Analyse des données	32
2.1.1. Analyse microbiologique des échantillons d'eau.....	32
2.1.2. Analyse physico chimique des échantillons d'eau.....	33
2.2. Résultats obtenus sur le rendement en cellules	33
Chapitre III : Discussion.....	35

Chapitre IV : Recommandations	37
4.1. Au LABOCEL	37
4.2. Aux chercheurs	37
4.3. A l'Etat.....	37
CONCLUSION.....	38
BIBLIOGRAPHIE	39
BIBLIOGRAPHIE	40
WEBOGRAPHIE	43
ANNEXE	45
ANNEXE I: Milieu de croissance	45
ANNEXE II : Solution de Trypsine versene pour les subcultures.....	47
ANNEXE III : Résultats obtenus au LANSPEX pour l'analyse physico-chimique.....	48
ANNEXE IV : Résultats obtenus au LANSPEX pour l'analyse microbiologique	52

INTRODUCTION

Le Niger, pays sahélien, dispose au 1er janvier 2017, d'une population estimée à 21 546 595 de personne (ATLAS, 2018). Son cheptel est de 39.413.000 têtes en 2013 (NIGER, 2014) . Les productions animales contribuent à hauteur de 13% au Produit Intérieur Brut et 40% du (PIB) agricole (NIGER, 2010). Il intervient comme apport à hauteur d'au moins 25% au budget des collectivités territoriales.

Cependant, de nombreux facteurs freinent l'essor du sous-secteur de l'Élevage au Niger. On peut distinguer quatre principales causes qui interagissent d'une manière plus ou moins étroite :

- ✓ La persistance des maladies animales ;
- ✓ L'insécurité alimentaire du cheptel ;
- ✓ La faiblesse du système de recherche et de vulgarisation en productions animales ;
- ✓ L'environnement institutionnel et financier des filières peu performant.

Le Ministère en charge de l'Elevage a conçu une Stratégie De Développement Durable (SDDEL), couvrant la période 2013-2035 (NIGER, 2015), incluant des perspectives d'orientation à même de mieux exploiter le potentiel animal, c'est-à-dire d'améliorer la santé de son cheptel, son niveau de production et la valorisation de ses productions, tant en quantité qu'en qualité. Par ailleurs, l'intégration du Niger aux ensembles sous régionaux : la Communauté Economique des États de l'Afrique de l'Ouest (CEDEAO) et ; l'Union économique et monétaire ouest-africaine (UEMOA) implique des actions concertées en termes de transhumance, de contrôle sanitaire des animaux et de fiscalisation. Pour sa mise en œuvre, trois axes stratégiques sont retenus. Pour le premier axe ; il s'agit d'abord d'améliorer la santé animale et de garantir la qualité des denrées et des produits issus de l'élevage. Pour lutter contre les maladies, un des volets est la prophylaxie médicale c'est-à-dire la vaccination. D'où la création du Laboratoire Central de l'Elevage (LABOCEL) ; qui produit des vaccins contre les maladies prioritaires dont celles dues à des virus. Malheureusement, le LABOCEL rencontre des difficultés dues à la vétusté du plateau technique, qui fait que le processus de production est ralenti et le rendement n'atteint pas l'optimum. Il a été constaté une baisse de prolifération des cellules VERO, ce qui nous amène à investiguer au niveau du dispositif de production d'eau distillée pour la préparation des milieux de culture. Effectivement ; ce dispositif est défaillant, on se posait la question à savoir si l'eau provenant de ce dernier répond aux normes internationales, concernant les cultures cellulaires, sinon cette eau serait-elle à la base du baisse de rendement des cellules VERO ?

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris ce travail dont l'objectif général est d'accroître la production de vaccin sur cellules « VERO » au LABOCEL; en utilisant pour la préparation des milieux de culture une eau de qualité qui répond aux normes.

De façon spécifique, il s'agit de :

- Etudier la qualité physico-chimique et microbiologique d'échantillons d'eau
- Evaluer l'effet des types d'eau sur le rendement des cellules VERO.

Cette étude comporte deux parties. La première partie qui est une synthèse bibliographique porte sur un rappel sur l'utilisation des cultures cellulaires dans le processus de production de vaccins, des données générales sur la culture cellulaire et des facteurs susceptibles d'influencer sa réussite, surtout la qualité de l'eau. Quant à la seconde partie, elle est consacrée à la présentation du site d'étude, le LABOCEL, à la méthodologie, aux résultats et leur discussion et aux recommandations.

PARTIE I :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Vaccins et culture de cellules animales

La culture de cellules animales permet la production de nombreuses molécules thérapeutiques telles que des vaccins et des protéines recombinantes (BROU, 2012).

La vaccination consiste à introduire chez un individu une préparation antigénique dérivée ou proche d'un agent infectieux déterminé, de manière à créer une réponse immunitaire capable de le protéger contre la survenue d'une maladie liée à cet agent infectieux. Les vaccinations constituent un instrument essentiel en santé publique (MASSIP, 2002)

1.1. Les différents types de vaccins

1.1.1. Vaccins vivants

Il s'agit de mutants avirulents ou peu virulents, qui ont été sélectionnés à force de passage en série chez le nouvel hôte (lapin, œufs embryonnés) ou en culture de cellules mais qui ont conservé la propriété de se multiplier chez l'hôte naturel et donc d'y induire une réponse immunitaire de longue durée (OGER et al. 2013).

1.1.2. Vaccins tués ou inactivés

Ils sont constitués d'agents infectieux dont on a supprimé toute virulence par inactivation chimique (formol, propiolactone) ou physique (rayonnements ou chaleur) (OGER et al. 2013).

On retrouve aussi dans cette catégorie les vaccins sous unitaires et peptidiques (figure 1).

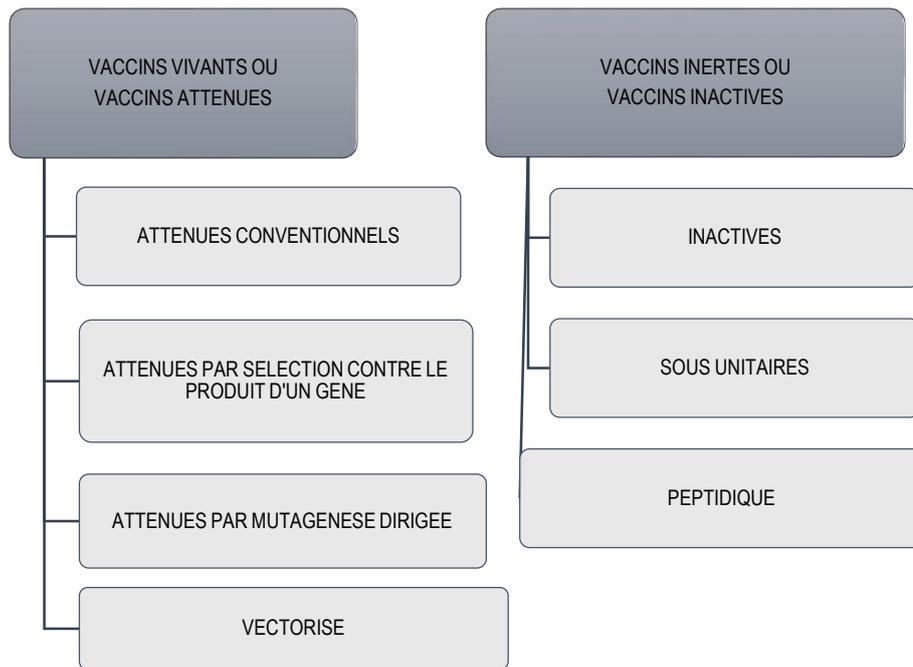


Figure 1: Les différents types de vaccins (QUINTIN-COLONNA, 2007)

1.2. Historique de la vaccination

1.2.1. L'antiquité et la variolisation

Dès l'antiquité, les anciens avaient déjà noté que certaines maladies graves interprétées comme étant des intoxications par des miasmes ambiants, ne pouvaient se contracter successivement à deux reprises. C'est seulement au XI^{ème} siècle, en Chine, que l'on retrouve des traces précises de la pratique de la variolisation ; les chinois utilisaient alors le pus ou les squames broyées d'un patient et les plaçaient dans les narines d'un sujet sain (DUIGOU, 2010).

1.2.2. Fondement du principe de la vaccination par Jenner

Le 14 mai 1796, Edward Jenner fait date en établissant une première approche scientifique de la vaccination : il inocule du pus de vache variolée à un jeune enfant James Phipps (CRETOT, 2013). Un mois après, il vérifie l'immunité en inoculant cette fois du pus humain. Il publie par la suite un premier traité en 1798 : "An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae...". Jenner pose également les bases de la revaccination, observant que l'immunité n'est pas définitive.

1.2.3. Louis Pasteur et le principe de l'atténuation

Il vaccine en 1885, pour la première fois, un enfant mordu par un chien atteint de rage (CURTIS, 2015). Dès 1932, la fabrication de vaccins viraux est entreprise avec un réel essor en 1949 grâce à l'élaboration des techniques de cultures tissulaires permettant la production en grande quantité des virus et des vaccins viraux vivants atténués ou inactivés.

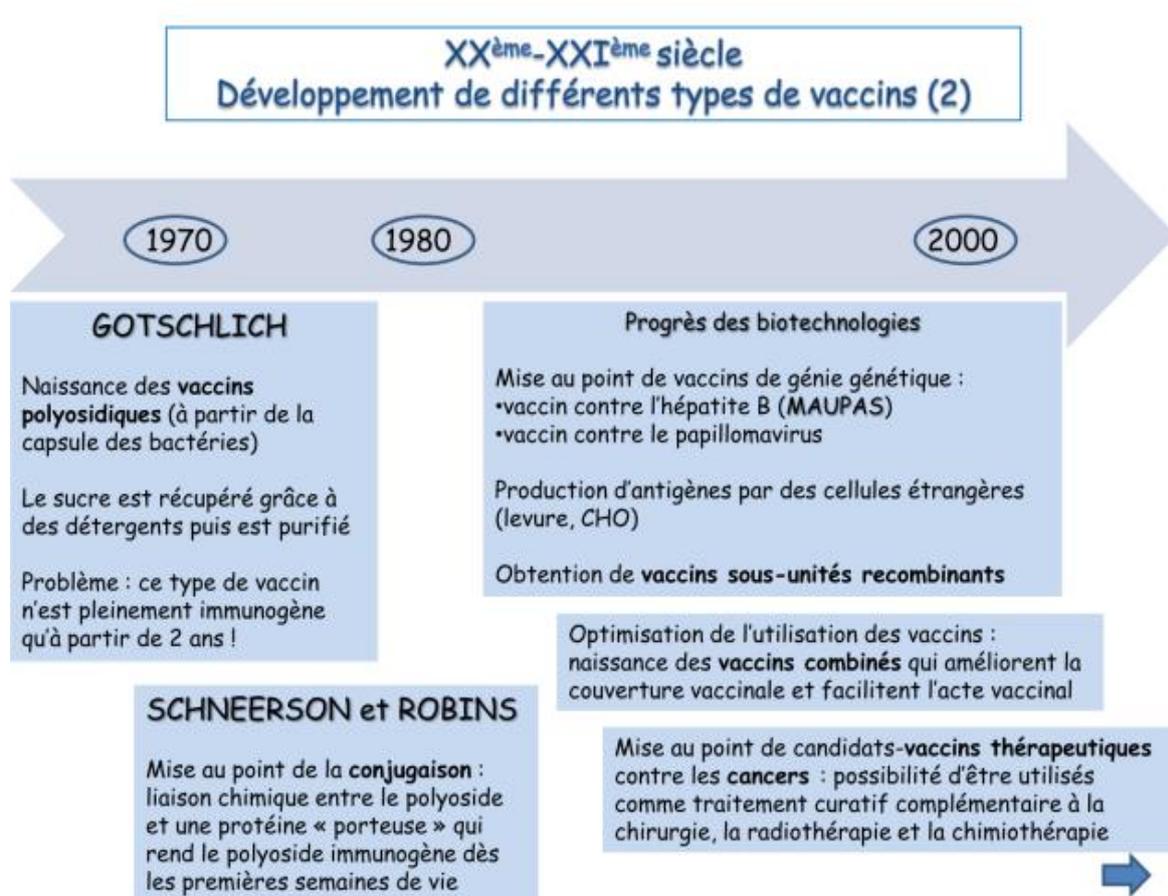


Figure 2: Développement de différents types de vaccins (BOQUEL et al. 2013)

1.3.Culture des cellules animales

Ce sont des cultures *in vitro* de cellules, de tissus et d'organe dans un milieu artificiel, c'est à dire, de composition connue et sans variations dues au métabolisme (Georgia & Xavier 2014).

1.3.1. La cellule animale

La cellule (en latin cellula signifie petite chambre) est l'unité structurale, fonctionnelle et reproductrice constituant tout ou partie d'un être vivant (CHELLI, 2013).

Les biologistes distinguent deux types fondamentaux de cellules selon qu'elles possèdent ou non un noyau (CHELLI, 2013) :

- Les procaryotes dont l'ADN est libre dans le cytoplasme (les bactéries, par exemple). Les procaryotes sont des cellules plus primitives, qui sont apparues en premier au cours de l'évolution, il y a 3, 5 milliards d'années. Ce groupe se subdivise en deux autres : celui des eubactéries et celui des archéobactéries.
- Les eucaryotes qui ont une organisation complexe (les animaux et les végétaux), renfermant de nombreux organites et dont l'ADN est enfoui dans le noyau entouré d'une membrane nucléaire.

1. Nucléole
2. Noyau
3. Ribosome
4. Vésicule
5. REG
6. Appareil de Golgi
7. Cytosquelette
8. Réticulum endoplasmique lisse
9. Mitochondries
10. Peroxisome
11. Cytosol
12. Lysosome
13. Centrosome (constitué de deux centrioles)
14. Membrane plasmique

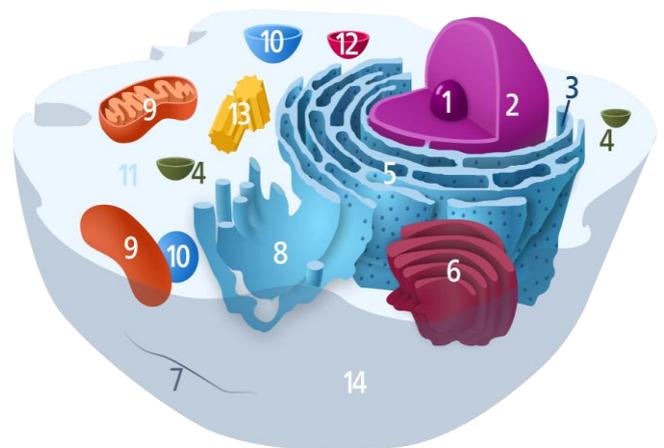


Figure 3 : cellule animale en 3 D (Google 2017)

Le rôle des éléments structuraux de la cellule animale (figure 3) sont décrits dans le tableau I :

Tableau I : fonction des organites de la cellules (**HARZOUZ, 2017**)

Organites	Structure	Fonction
Réticulum endoplasmique lisse	Cannalicules (petit canaux) délimités par une membrane	Fabrication des lipides membranaires et des hormones stéroïdes
Appareil de Golgi	Plusieurs dictyosomes	Maturation des protéines les tris les emballages des protéines
Réticulum endoplasmique granuleux	Cannalicules délimités par une membrane et recouvert de ribosomes	Synthèse des protéines
Le noyau	Limité par une enveloppe nucléaire et il renferme la chromatine, 1 ou 2 nucléoles et le nucléoplasme	Dépositaire de l'information génétique de la cellule dont il contrôle le fonctionnement
Mitochondrie	Organites délimités par deux membranes séparées par un espace intermédiaire.	Respiration cellulaire qui permet la synthèse d'ATP (source d'énergie pour la cellule)
Cytosquelette (ce n'est pas un organite)	Réseau de filaments protéique qui s'entrecroisent au sein de la cellule	Soutien de la cellule, mouvement cellulaire et intracellulaire, cohésion entre les cellules.

1.3.2. Différents types de cultures cellulaires

Il existe trois types de cultures cellulaires: la culture d'organe, les cellules en culture primaire et les lignées cellulaires (BARLOVATZ, et al., 2003).

1.3.2.1.Culture d'organe

Elle consiste à faire survivre quelques heures à quelques semaines un organe, un tissu ou un de leurs fragments, en conservant son intégrité et son architecture (JEANNESSON , 2007)

1.3.2.2.Culture primaire

La culture primaire est la culture initiale établie à partir d'un tissu. Sa composition cellulaire est donc hétérogène et très proche de celle du tissu originel (JULIETTE, 2014). La nature du tissu prélevé peut être différente: soit il s'agit d'un fragment tissulaire solide, soit il s'agit d'une suspension cellulaire tels que les épanchements pleuraux ou abdominaux (JULIETTE, 2014). Il faut remonter à la moitié du dernier siècle pour observer les premières applications industrielles des procédés de culture de cellules animales (KRETZMER, 2002).Celles-ci concernaient principalement la production de vaccin.

1.3.2.3. Lignés cellulaires

Elles sont le plus souvent constituées de cellules tumorales ou de cellules «transformées», chimiquement ou via un virus oncogène, et possèdent la caractéristique de pouvoir se diviser de façon illimitée (LANGDON 2004).

On distingue les lignées cellulaires finies (Tableau II) qui présentent une dégénérescence des cellules au bout d'un certain nombre de repiquages, des lignées continues à durée de vie illimitée.

Tableau II : Lignées cellulaires les plus utilisées dans les procédés industriels (MARC & OLMOS 2010)

Cellules	Origine	Applications
Vero	Cellules épithéliales de rein de singe vert	Vaccin viraux humains et vétérinaires
ST	Cellules épithéliales de testicules de porc	Vaccin viraux vétérinaires
MDCK	Cellules épithéliales de rein de chien	Vaccin viraux vétérinaires
CHO	Cellules d'ovaire de hamster chinois	Protéines recombinantes
BHK	Cellules de rein de bébé hamster	Facteur VIII
HEK293	Cellules épithéliales de rein humain transformées	Adénovirus
PER.C6	Cellules de rétine humaine	Protéines recombinantes
NS0	Cellules de myélome de souris	Protéines recombinantes
Hybridomes	Cellules hybrides murines	Anticorps monoclonaux
Sf9 High-5	Cellules d'insectes	Protéines recombinantes

1.4.Repiquage

Le repiquage permet une diminution de la densité cellulaire afin de maintenir une croissance optimale par le biais d'une dilution des cellules, précédée ou non d'une étape de dissociation enzymatique selon le procédé de culture. Cette technique constitue la première étape menant à une lignée cellulaire, et est indispensable pour le maintien d'une bonne croissance cellulaire. En effet, si les cellules arrivent à confluence (100% de recouvrement), elles rentrent en phase plateau, synonyme d'une diminution nette de la croissance (MACLEOD, 2004).

1.4.1. Principe

Le repiquage, ou encore «passage», consiste à ensemer un nouveau milieu de culture cellulaire, dès lors que les cellules recouvrent 70 à 90% de la surface du flacon de culture, ou que le milieu change de couleur, synonyme d'une acidification et donc d'un appauvrissement en nutriments (MACLEOD, 2004).

1.4.2. Méthode

Pour les cultures en monocouche une première étape de trypsination sera nécessaire (MACLEOD, 2004) :

- le milieu de culture est retiré du flacon à l'aide d'une pipette.
- les cellules sont ensuite nettoyées deux fois avec une solution tampon PBS pour éliminer toutes traces de sérum pouvant inactiver la trypsine.
- la trypsine est ensuite incorporée dans le flacon contenant les cellules adhérentes, en prenant bien soin de l'étaler de façon homogène de façon à ce qu'elle agisse sur toutes les cellules.
- Les cellules sont ensuite incubées à 37°C avec une durée d'incubation pouvant varier de 1 à 20 minutes selon la facilité des cellules à se détacher. Il faut garder à l'esprit que moins elles sont en contact avec la trypsine, mieux c'est. Ainsi des contrôles réguliers, toutes les 2 minutes environ, doivent être réalisés, soit à l'œil nu, soit au microscope inversé, afin de contrôler le détachement des cellules. Il peut être intéressant de tapoter sur le flacon de culture, au moment du contrôle, pour faciliter la dissociation, ou alors d'utiliser une technique de pipetage/refoulement à l'aide d'une pipette pour dissocier les amas cellulaires.

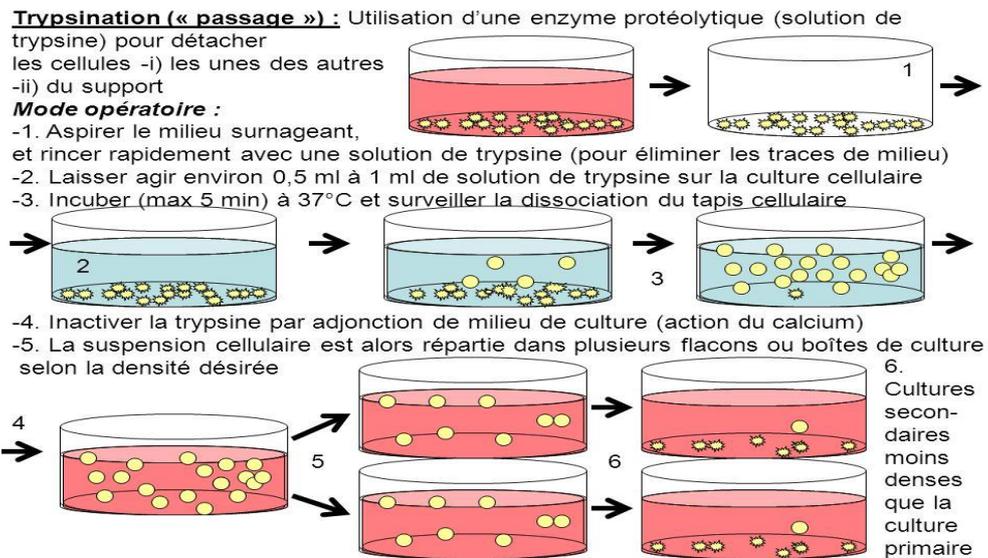


Figure 4 : Techniques de culture cellulaire (PEDEUTOUR, 2009)

1.4.3. Comptage des cellules avec l' hématimètre de Bauer

C'est une méthode d'estimation du nombre de cellules viables d'une suspension cellulaire (FAO, 2003). Avant de commencer le processus du comptage, des précautions sont à prendre :

- Nettoyer la surface de la lame de numération avec de l'alcool à 70% en prenant soin de ne pas gratter la surface
- Nettoyer la lamelle avant de la déposer sur la lame de numération

La présence d'anneaux arc en ciel de Newton (entre la lame et la lamelle) signifie que la lamelle est bien collée à la lame (FAO, 2003).

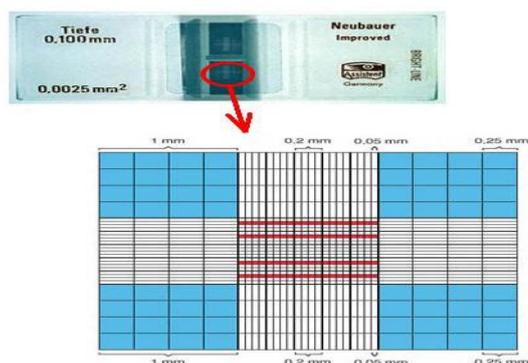


Figure 5: cellule de Neubauer (MIK-MAG, 2018)

1.4.3.1. Instructions chronologiques

Veiller à l'homogénéité et à la représentativité de l'échantillon de la suspension cellulaire (FAO, 2003).

- Homogénéiser soigneusement l'échantillon de la suspension cellulaire ;
- Mélanger 0,5 ml de cette suspension avec 4,5 ml de la solution de bleu de trypan ;
- Homogénéiser le mélange avant de le laisser au repos pendant 10 minutes à la température ambiante ;
- Homogénéiser le mélange avant d'en prélever 20 μl à l'aide d'une micropipette ou d'une pipette pasteur ;
- Déposer immédiatement cet échantillon dans un coin de l'hématimètre et laisser la suspension s'épandre sous la lamelle par capillarité. Prendre soin de ne pas transférer trop ou pas assez de suspension cellulaire. Dans le premier cas, aspirer le surplus de suspension avec un buvard ;
- Observer la lame au microscope avec le grossissement X 10 en faisant la mise au point sur la partie centrale de l'hématimètre et sur les lignes de la grille.

1.4.3.2. Interprétation des résultats :

Avec un hématimètre de type New Bauer, le volume de chaque grand carré est 1mm x 1mm x 0.1mm = 10^{-4} cm^3 le facteur de multiplication sera de 10.000 (FAO, 2003). Le nombre de cellules par millilitre (N) pour une catégorie donnée (vivantes ou mortes) se calcule comme suit en tenant compte de la dilution initiale au 1/10^{ème} dans le bleu de trypan :

$m \times 10.000 \times 10$

*m = moyenne des cellules comptées.

% des cellules mortes : $\frac{\text{Nombre de cellules colorées} \times 100}{\text{Nombre total de cellules comptées}}$

La numération peut être inexacte si l'échantillon n'est pas homogène ou si la distribution des cellules n'est pas faite au hasard sur la lame. Pour éviter ce problème, il faut diluer la suspension cellulaire de manière à ne pas avoir plus de 40 cellules par carré. Si deux numérations diffèrent de plus de 20%, il faut refaire l'échantillonnage et une autre numération (FAO, 2003).

1.4.4. Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est le processus qui permet la division des cellules. Il est composé de :

- L'interphase : caractérisée par un accroissement du volume cellulaire. la cellule transcrit ses gènes et les chromosomes sont dupliqués ;
- La phase mitotique : elle correspond à l'étape de la division cellulaire chez les cellules non sexuelles des organismes eucaryotes, c'est-à-dire qui possèdent un noyau. Elle se déroule en plusieurs phases, commence après la duplication de l'ADN et se termine avec la séparation des deux cellules filles).

Chez les cellules dites « normales », chaque phase du cycle est régulée par un réseau complexe de kinases, inhibiteurs et autres molécules de signalisation. Des points de surveillance sont constamment sollicités afin d'arrêter la division cellulaire à la moindre anomalie (KASTAN & BARTEK , 2004). En revanche, les cellules cancéreuses possèdent un cycle cellulaire dérégulé et une absence de points de surveillance (WILLIAMS & STOEBER , 2012).

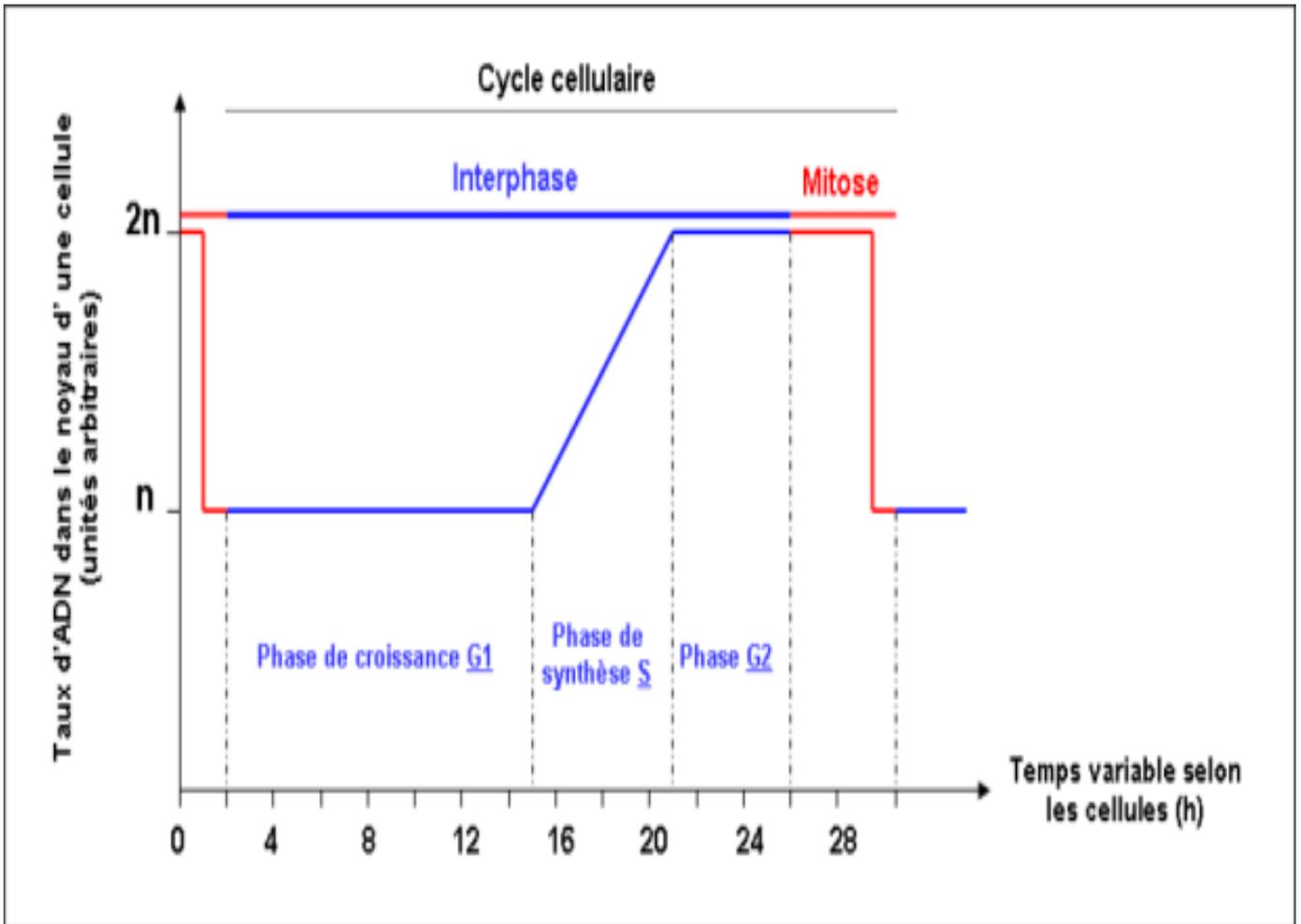


Figure 6: Évolution de la quantité d'ADN par cellule au cours d'un cycle cellulaire (UNISCIEL , 2018)

1.4.5. Contaminations microbiennes

Au sein d'une culture cellulaire, deux types de contaminations sont possibles: les contaminations microbiennes et les contaminations par d'autres lignées cellulaires.

Un récapitulatif des différents agents, de leurs conséquences sur la culture, des moyens de détection ainsi que de lutte est présenté dans le Tableau II.

Tableau III : Données récapitulatives des agents contaminants et de leurs propriétés (LANGDON 2004)

	Aspect	Sources de contamination	Conséquences sur la culture	Détection	Elimination
Mycoplasmes	Petits procaryotes de 0,3 à 0,8µm très difficilement visibles au microscope	Lignées cellulaires provenant de l'extérieur Sérum Milieu de culture Manipulateurs	Baisse de la croissance Baisse de l'adhérence Modification phénotypique	Culture microbiologique fluorescence ADN PCR Hybridation ADN Microscope électronique à transmission Immunodétection	Antibiotiques: Quinolone Tétracycline Macrolide
Bactéries	Coques, bacilles, spiralés, etc.	Mauvaise asepsie Bain Marie Milieu	Baisse du pH Augmentation de la turbidité et aspect trouble du milieu Aspect granuleux de la culture	Observation au microscope Culture microbiologique	Elimination de la lignée ou Antibiotiques (Pénicilline et streptomycine)
Champignons	Filaments micellaires, Spores	Aéro-contamination	Aspect «chevelu» de la culture Modification du pH	Mise en évidence des spores Culture microbiologique	Antimycotique: amphotéricine B ou mycostatine
Levures	Petite forme ovoïde, ou chainettes plus ou moins ramifiées	Aéro-contamination	Aspect trouble du milieu Modification de pH	Culture microbiologique	Antimycotique: mycostatine
Virus		Sérum Lignées cellulaires provenant de l'extérieur	Peuvent être cytopathogène	PCR Microscope électronique à transmission Immunodétection	

Chapitre II : Paramètres influençant la culture cellulaire

Il est nécessaire de connaître les paramètres biologiques de la cellule animale utilisée et de maîtriser leur impact sur la croissance cellulaire et la production de la molécule d'intérêt (BROU, 2012). En effet, la connaissance des paramètres optimaux pour la croissance et la production de la molécule d'intérêt permet de définir les conditions opératoires du procédé de culture.

L'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer le comportement des cellules est illustré sur la figure (Figure 7) :

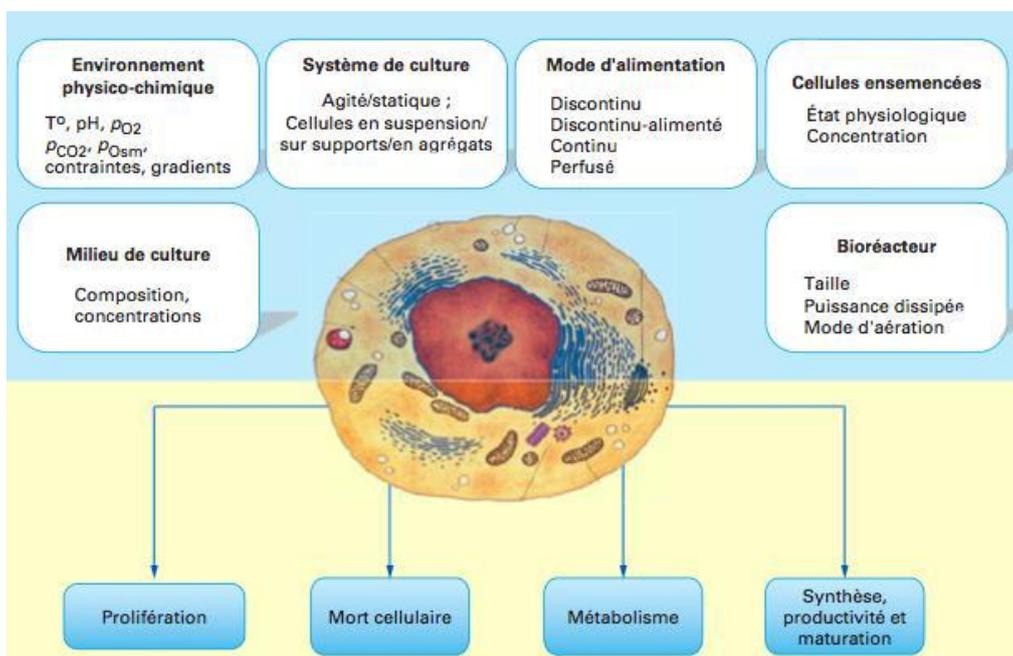


Figure 7:Facteurs du procédé de culture susceptibles d'influencer le comportement des cellules animales (MARC & OLMOS 2010)

Selon la figure 7 ; plusieurs paramètres ont une influence sur la prolifération des cellules en culture :

2.1. La température

La température optimale de croissance est de 37 °C pour les cellules de mammifères et de 27 °C pour les cellules d'insectes. Ce paramètre doit être rigoureusement contrôlé dans le bioréacteur (avec un écart de 0,5 °C) (DUCOMMUN , 2002).

2.2. Le pH

Les cellules animales ne tolèrent que de faibles variations de pH et doivent ainsi être cultivées dans un milieu dont le pH reste compris entre 6,5 et 7,8 selon les cellules, la valeur optimale se situant généralement autour de 7,3 (BARBOUCHE, 2008 ; MARC. A, 2010).

2.3. Osmolalité

L'osmolarité optimale pour la culture de cellules animale est de l'ordre de 300 mOsm. kg⁻¹, celle-ci est maintenue par la présence de sels dans le milieu (OLSEN, 2008). Cependant, l'ajout ponctuel de solutions nutritives concentrées ou de base pour contrôler le pH est susceptible d'augmenter cette osmolarité. En cas d'hyperosmolalité (jusqu'à 400 mOsm. kg⁻¹), un ralentissement de la vitesse spécifique de croissance cellulaire est observé (CHAUDHRY, et al., 2009) alors que la vitesse spécifique de production est généralement augmentée (CHERLET, et al., 1999).

2.4. Tension de l'oxygène dissout

La tension de l'oxygène dissout (DO) est un paramètre qui a une forte influence sur la culture cellulaire. Par exemple, l'équipe de Sauer et al. (2000) a démontré que l'oxygène favorise la différenciation *in vitro* de cellules souches embryonnaires (ES) en cellules cardiaques et en cellules hématopoïétiques. Dans les systèmes de culture cellulaire, le taux de consommation d'oxygène des cellules doit être déterminé de sorte que l'oxygène soit alimenté d'une manière précise afin d'éviter des variations ou limitations (KALLOS, et al., 1999).

2.5. Milieux de culture

Le milieu de culture apporte des éléments nutritifs et bioactifs nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. Il peut être également impliqué dans la protection des cellules par rapport aux contraintes hydrodynamiques et dans la limitation des variations de pH par sa fonction tampon.

Selon les milieux cellulaires de base et l'objectif de culture pour lesquels on les utilise, les composants ne seront pas les mêmes. Néanmoins, il existe des éléments essentiels qui seront retrouvés dans la plus grande majorité des milieux de bases et qui sont indispensables pour la survie des cellules (CEZARD, 2013) (Tableau IV).

Tableau IV : Besoins Nutritifs des Cellules (Georgia & Xavier , 2014)

Eau		
Sels minéraux	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ Cu, Zn, Co, Fe	Maintien de la PO Cofacteurs enzymatiques Rôle de facteurs d'adhésion (Ca ²⁺) Oligoélément
Source d'énergie	Glucose Glutamine	Principale source d'énergie <i>in vitro</i> elle alimente la néoglucogénèse
Acides aminés	Gln, Leu, Thr, Lys, Trp, Phe, Val, Met, lieu, Tyr, Cys, Arg, His	Indispensables car ils ne peuvent pas être synthétisés <i>in vitro</i>
Vitamines	acide folique, pyridoxal, riboflavine, thiamine, inositol, acide nicotinique, acide panthoténique, choline	Coenzyme Précurseur des bases puriques et pyrimidiques
Facteurs de croissance	PDGF FGF EGF	Hypertrophie (augmentation de taille) Hyperplasie (augmentation de la population cellulaire) Différenciation cellulaire
Facteurs d'adhésion	glycoprotéines calcium dépendante ou non fibronectine (fibroblaste) chondronectine (chondrocytes) collagène (toutes les cellules)	Adhésion des cellules au support
Protéines de transport	Albumine Transferrine	Transport des AG Transport du fer

Chapitre III : Les cellules « VERO »

3.1. Origine et historique de la lignée cellulaire Vero

La lignée *Vero* fut isolée à partir de cellules épithéliales de rein extraites d'un singe vert africain (*Chlorocebus* esp.; précédemment nommée *Cercopithecus aethiops*, ce groupe de singes ayant été subdivisé en plusieurs espèces différentes). La lignée a été développée le 27 mars 1962, par Yasumura et Kawakita à l'Université de Chiba, au Japon (YASUMURA, et al., 1963). La souche originale fut nommée « Vero » d'après l'abréviation de « Verda Reno », qui signifie « rein vert » en espéranto, tandis que « *Vero* » signifie « vérité » dans cette même langue (SHIMIZU, 1993).

Les cellules Vero ont été cultivées, dans un premier temps, en flacons de Roux (MONTAGNON, et al., 1981; SAITO, et al., 1981), puis sur micro porteurs lisses ou macroporeux présentant de nombreux avantages pour la production à grande échelle (WHITE, 1990; SOUZA, 2007).

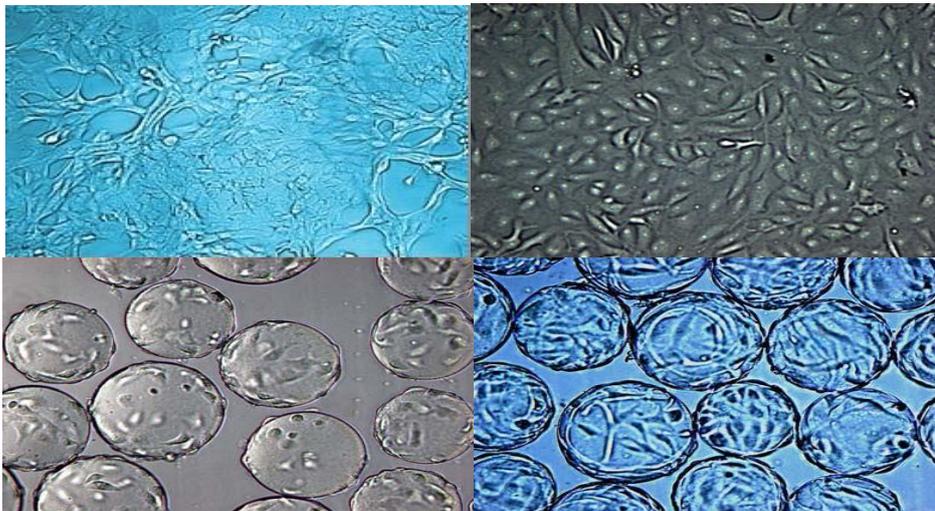


Figure 8 : Cellules Vero cultivées en flacon de culture cellulaire (en haut après 2 et 3 jours de culture) et sur microporteurs (en bas après 1 et 3 jours de culture) (PETIOT, 2009)

3.2. Caractéristiques des cellules « Vero »

La caractérisation initiale de cette lignée cellulaire en tant que substrat pour la production de vaccins viraux a été réalisée dans les années 1980 par l'Institut Mérieux, maintenant connu sous le nom de Sanofi Pasteur. Ces propriétés (Tableau V); ont permis l'utilisation de cette lignée pour la production de vaccins humains selon les exigences et réglementations imposées par l'organisation mondiale de la santé (OMS, 1982).

Tableau V: Propriété de la cellule Vero (PETIOT, 2009)

Origine	Rein de singe vert adulte d'Afrique
Transformation	Naturelle : au cours des passages successifs
Tumorigénicité	Non tumorigène (d'après la définition du WHO) : <i>Pas de nodules dont la taille augmente avec le temps (>21 j)</i> <i>Pas de métastases</i>
Caryotype	Aneuploïde : 58 chromosomes dans 66% des cellules
Culture	Adhérente
Reference ATCC	CCL81, 124 ^e passage
Traçabilité	Suivie depuis son origine, traçabilité complète (milieu, sérum)
Permissivité	SV-40, SV-5, rougeole, arbovirus, reovirus, rubeole, adénovirus simien, poliovirus, grippe, virus respiratoire syncytial, virus vaccinia ...
Caractéristique	Ne produit pas d'interférons

Chapitre IV : Eau pour culture cellulaire

La qualité de l'eau joue un rôle important dans la croissance des cultures de cellules (GROSMAN, 2004).

L'eau utilisée dans les cultures cellulaires doit donc être exempte de micro-organismes et, en particulier des endotoxines, des ions inorganiques (métaux lourds tels que le plomb, le zinc, etc.), et composés organiques (acides humiques, tanins, pesticides, etc.).

Le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) catégorise l'eau utilisée dans les procédures de laboratoire en trois classes (LUC, 2002). Toutes ces classes sont détaillées dans le tableau V.

Tableau VI : Spécifications des différents types d'eau purifiée (NCCLS, 1997)

DESCRIPTION	NCCLS		
	I	II	III
Conductivité à 25° C ¹ (micromhos/cm, max.)	0,1	1,0	10,0
Résistivité électrique à 25° C (mégohm.cm, min.)	10,0	1,0	0,1
Matières en suspension ²	Filtre 0,2 (µm)	N/A ³	N/A ³
Silicate (mg/L)	0,05	0,1	1,0
Dénombrement de bactéries hétérotrophes (UFC/mL, max.)	10	1.000	N/A ³
pH à 25° C	N/A ³	N/A ³	5,0 – 8,0
Contaminants organiques ²	Charbon activé ou alambic ou osmose inverse	N/A ³	N/A ³

¹ : La conductivité est l'inverse de la résistivité électrique

² : C'est un procédé de purification non évalué par l'utilisateur

³ : N/A = non applicable

4.1. Eau de type I – NCCLS

L'eau purifiée de type I doit être traitée au charbon actif et filtrée à l'aide d'un filtre de 0,2 µm dans le but d'enlever les matières organiques dissoutes et les particules (bactéries et autres) de taille supérieure à 0,2 µm. Cette eau n'est pas stérile et doit être utilisée immédiatement après sa production. Elle est utilisée pour effectuer des analyses hautement sensibles nécessitant un minimum d'interférence (ex. cultures cellulaires, préparation d'étalons, etc.).

4.2. Eau de type II – NCCLS

Cette eau est de qualité inférieure à la précédente. Elle peut servir aux analyses de routine ne nécessitant pas une eau de type I ou une eau ultra-pure.

4.3. Eau de type III – NCCLS

Ce type d'eau peut être rencontré dans des centres hospitaliers ayant des réservoirs d'eau purifiée alimentés par un alambic ou d'autres systèmes (ex. résine, osmose inverse). Cette eau peut servir à alimenter des unités de purification d'eau aux points d'usage pour obtenir une qualité d'eau purifiée supérieure. Elle peut aussi servir au rinçage et au lavage de la verrerie de laboratoire. Cependant, le dernier rinçage devrait être fait préférentiellement avec une eau de la même qualité que celle utilisée pour faire l'analyse.

Au LABOCEL, nous utilisons l'eau de type II pour les cultures cellulaires.

PARTIE II :
ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériel et méthodes

1.1.. Matériel

L'étude sur les cellules « Vero », s'est déroulée au Laboratoire Central de l'Elevage (LABOCEL) de Niamey, du 23 mai 2016 au 16 novembre 2017. Les activités ont été menées au niveau du Service de Production des Vaccins Viraux (SPVV).

1.1.1. Présentation du LABOCEL

Le Laboratoire Central de l'Elevage (LABOCEL) fut créé en 1965.

Ses missions actuelles, déterminées par l'Ordonnance n° 2009-20 du 03 novembre 2009 l'érigant en établissement public à caractère administration (EPA), sont énumérées ainsi qu'il suit (NIGER, 2016) :

- 1) le diagnostic des maladies animales;
- 2) la participation à la conception, l'exécution et le suivi des programmes de recherche appliquée ;
- 3) la participation à la conception et à l'exécution des programmes de surveillance des maladies ;
- 4) les analyses microbiologiques des aliments d'origine animale ;
- 5) les analyses biologiques, chimiques et biochimiques des produits et sous-produits animaux ;
- 6) la production et le marketing des produits biologiques y compris les vaccins et les sera,
- 7) le recyclage des agents en techniques de diagnostic des agents pathogènes d'intérêt vétérinaire ;
- 8) la publication des résultats.

Le LABOCEL produit sept (7) types de vaccins, représentés dans le tableau VI.

Tableau VII : Différents types de vaccins produits au LABOCEL

Maladies animales	Types de vaccins
La Peste de Petits Ruminants	Vaccin contre la peste de petits ruminants (OVIPESTIVAC)
La péripneumonie contagieuse des bovins	Vaccin contre la péripneumonie contagieuse des bovins (PERIVAC)
Le charbon bactérien	Vaccin contre Le charbon bactérien (CARBOVAC)
La pasteurellose des gros ruminants	Vaccin contre la pasteurellose des gros ruminants (PASTOBOVAC)
Le charbon symptomatique	Vaccin contre Le charbon symptomatique (SYMPTOVAC)
La pasteurellose des petits ruminants	Vaccin contre la pasteurellose des petits ruminants (PASTOVAC)
La dermatose nodulaire des bovins et clavelée des petits ruminants	Vaccin contre la dermatose nodulaire des bovins et la clavelée des petits ruminants (DERMOVAC)

Ainsi, sur les sept types de vaccins produits au LABOCEL ; deux sont des vaccins viraux (OVIPESTIVAC et DERMOVAC).

1.1.2. Matériel technique et biologique

Matériel	Utilisation
Matériel biologique	
Cellules VERO certifiées (ATCCE, EACC, PANVAC)	Culture cellulaire
Sérum de veau fœtal gamma irradié	Préparation du milieu de culture ; il apporte : facteurs de croissance, fibrinolectine, des éléments tampon
Milieus, solutions et réactifs	
Eau (ER ; ED ; ERD ; EDD) ; Milieu d'Eagles modification de Glasgow (GMEM) ; Solutions mères d'antibiotiques et d'antifongiques	Préparation du milieu de culture
Solution de trypsine /EDTA	Décollage des cellules de la paroi du support
Solution mère de bleu de trypan	Coloration des cellules pour comptage
Équipement	
Autoclave, Four pasteur	Stérilisation du matériel
Distillateur	Purification de l'eau
pH mètre ; Filtre (millipore ou Seitz) et membranes filtrantes ; Agitateur magnétique	Préparation et stérilisation du milieu de culture
Hotte à flux laminaire de Class II ; Incubateur normal	Culture cellulaire
Centrifugeuse réfrigérée	Recueil du « dépôt » pour comptage cellulaire
Hématimètre de Newbauer	Comptage cellulaire
Microscope inversé	Visualiser et compter les cellules
Consommables de labo	
Béchers en verre ; Erlenmeyers ; Flacons pyrex ; Tubes à essai ; Pipettes ; Epprouvettes graduées ; Flacons de Roux pour culture cellulaire de 25, 75, 150 cm ²	Culture cellulaire ; préparation des milieux, comptage cellulaire

ER : eau du robinet
ED : eau minérale Dallol

ERD : eau du robinet distillée
EDD : eau Dallol distillée

1.2. Méthode d'étude

Elle consiste à faire analyser (analyse physico-chimique et microbiologique) les différents échantillons d'eau au Laboratoire National de Santé Publique et d'Expertise (LANSPEX), ensuite faire l'étude au LABOCEL avec utilisant ces échantillons d'eau pour cultiver les cellules « Vero », afin de détecter leur influence sur ses dernières.

1.2.1. Méthode d'étude au LANSPEX

Les échantillons d'eau sont prélevés dans des flacons en verre blanc, à haut évasé, avec un bouchon en verre rodé, d'une capacité de 125 ml, stérilisés au préalable. Avant d'être stérilisés, les flacons pour la collecte d'eau du robinet doivent recevoir 0,1 mL (2 gouttes) de thiosulfate de Sodium à 10%.

Avant de prélever l'eau du robinet, la procédure suivante a été suivie :

- Lavage des mains avec de l'eau et du savon ;
- Nettoyage du robinet avec un morceau de coton imbibé avec de l'hypochlorite de sodium à 100mg/L;
- Ouverture du robinet afin de laisser couler l'eau pendant 1 ou 2 minutes;
- Collection de l'échantillon d'eau au $\frac{3}{4}$ du volume ;
- Mettre le flacon contenant l'échantillon dans une caisse d'isopor avec de la glace;
- Sceller, identifier et envoyer la caisse au laboratoire ;
- Le temps entre la collecte et l'examen de l'échantillon ne doit pas excéder 24 heures.

1.2.1.1. Analyse physico- chimique des échantillons d'eau

Les ions sulfates ; le fer ; le chlore total ; le chlore libre ; les ions nitrates et nitrites ; les fluorures ; sont déterminés par la méthode de spectrophotométrie. La Méthode du RODIERS (9^{ème} édition) est utilisée pour la détermination du magnésium; calcium ; les ions CaCO_3 et chlorures. Les méthodes de conductimétrie et turbidimétrie sont également utilisées.

a) La spectrophotométrie

Les échantillons d'eau sont préparés de la manière suivante :

Les deux faces transparentes d'une cuve à faces parallèles sont repérées ; ensuite appuyer, sur le bouton A du « Mode » de l'appareil et remplir la cuve aux $\frac{3}{4}$ du liquide. Avant chaque mesure d'absorption (pour ER ; ED ; ERD ; EDD), il faut « faire le blanc » en :

- Remplissant une seconde cuve à faces parallèles d'eau distillée (c'est le liquide employé pour ici solubiliser la substance suspecte) ;
- Choisir la valeur de λ (en nm) à l'aide des boutons ◀ et ▶ au niveau du symbole ☼ du tableau de commandes ;
- Introduire la cuve dans le portoir et fermer la porte ;
- Appuyer sur le bouton « zéro » : la valeur de A est mise à zéro.

Ensuite mesurer la valeur de l'absorption de lumière par la solution :

- Utiliser la cuve remplie aux $\frac{3}{4}$ du liquide.
- Juste après avoir fait le zéro, remplacer la cuve du « blanc » par l'échantillon à analyser et fermer la porte.
- Lire la valeur de A et la noter sur le cahier de recherche.
- Mesurer ainsi la valeur de A pour une gamme donnée de longueurs d'ondes pour chaque échantillon.

Remarque : Faire le blanc avant toute nouvelle mesure.

Messages d'erreurs :

L'affichage des données peut clignoter. Dans ce cas, l'échantillon à tester a une valeur de A supérieure ou inférieure à la gamme spectrophotométrique de l'appareil.

- Si on a « < - 0,1 » clignotant : l'échantillon est trop clair, il faut le concentrer, car la valeur de A est trop faible.
- Si on a « > 2,... » clignotant : l'échantillon est trop foncé, il faut le diluer avec de l'eau, car la valeur de A est trop élevée.

Si tel est le cas, il faut reprendre au début la série de mesures car le liquide à analyser a été modifié.

b) La conductimétrie

S'assurer que la température des eaux à tester est identique. Le conductimètre étant branché, appuyer l'interrupteur sur "On", ensuite immerger la cellule dans l'eau distillée et noter la valeur affichée.

- Répéter la mesure pour l'eau à tester et noter la valeur ;
- Rincer la cellule de mesure dans l'eau distillée, et répéter l'opération pour les différents échantillons ;
- Immerger la cellule dans la solution initiale et placer l'interrupteur en position "Off".

c) Turbidimétrie

- Démarrer l'appareil et le mettre sous tension ; laisser préchauffer environ 60 minutes, choisir le mode ratio ;
- Procéder à l'étalonnage une fois par mois ;
- Vérifier l'étalonnage avant chaque série de mesures avec des étalons de formazine et noter le résultat sur la feuille de travail ;
- Agiter l'échantillon et remplir dans une cuvette jusqu'au trait (environ 30 ml) ;
- Note : Afin d'éviter que les cuvettes ne s'embuent, s'assurer que les échantillons et les matériaux de référence sont à la température ambiante avant de procéder aux mesures ;
- Placer la cuvette dans le puit de mesure et fermer le capot et lire lorsque le signal est stable et noter le résultat.

d) Mesure du pH

Allumer le potentiomètre et attendre qu'il se stabilise;

- Laver les électrodes avec de l'eau distillée et les sécher avec du papier absorbant;
- Calibrer l'appareil avec des solutions standard (pH 4 – 7 ou 10);
- Laver de nouveau les électrodes avec de l'eau distillée et les sécher;
- Introduire les électrodes dans l'échantillon à être examiné et faire la lecture;
- Laver de nouveau et les laisser immergés dans l'eau distillée;
- Éteindre l'appareil.

1.2.1.2. Analyse microbiologique des échantillons d'eau

Les microorganismes tels que : flore aérobie mésophile ; *E. coli* ; les coliformes totaux ; les salmonelles ; les streptocoques fécaux et les anaérobies sulfite - réducteurs ont et été recherché dans les différents échantillons d'eau. La méthodologie utilisée est mentionnée dans le tableau VIII :

Tableau VIII : Méthode et milieux de culture / réactifs utilisés pour la détection des germes

Microorganismes	Milieux d'identification / Références	Incubation (Température °C/Temps Heures)		Normes	Méthodologies
Flore aérobie mésophile	Plate Count Agar (PCA) / Biokar BK144HA	30°C	72	NF EN ISO 6222, 1999	Dénombrement sur PCA
Coliformes totaux	Gélose Lactosée Biliée au crystal Violet et au Rouge neutre (VRBL) / Biokar BK152HA	30°C	24	NF ISO 4832, 2006	Dénombrement sur VRBL,
<i>Escherichia coli</i>	Rapid'E.coli / Bio-Rad 355 5299	37°C	24	EN ISO 16140, 2003	Isolement des souches sur Rapid'E.coli,
Anaérobies sulfito-réducteurs	Tryptone Sulfite Cyclosérine (TSC) / Biokar BK031HA	37°C	24	NF EN 13401, 2003	Dénombrement sur milieu TSC,
<i>Salmonella spp.</i>					Pré-enrichissement dans l'eau peptonée tamponnée
	Rapport-Vassiliadis / Conda 1240.00	37°C	24	ISO 6579 2002	Enrichissement sélectif avec du Rapport-Vassiliadis
	Salmonella-Shigella (Conda 1064.00) / Xylose-Lysine-Désoxycholate (Conda 610060)	37°C	24		Isolement sur le milieu Xylose-Lysine-Désoxycholate (XLD) et Salmonella-Shigella (SS).

1.2.2. Méthode d'étude au LABOCEL

Préparer quatre milieux de culture différents avec les quatre types d'eau. A partir de la banque de cellules « Vero » primaire, des passages successifs sont effectués selon le Mode Opérateur Standard (MOS) du LABOCEL pour obtenir ainsi une banque de travail.

Les données collectées après numérisation sur lame de Bauer; ont été saisies ensemble sur le support informatique *Excel* puis codées avant d'être analysées sur le logiciel minitab. Le test est basé sur l'analyse de la variance, par modulation du nombre de cellules en fonction du type d'eau; pour savoir si le traitement a eu un effet significatif sur le nombre des cellules.

1.2.2.1. Mode Opérateur pour la multiplication des cellules

Des précautions générales pour les travaux de cultures cellulaires doivent être observées avec en particulier :

- l'utilisation de hotte à flux laminaire de type II pour toutes les opérations en circuit ouvert ;
- le maintien des cellules de lignée selon le système de lot de semence de cellules ;
- l'utilisation des cellules avant leur 20^{ème} passage depuis la culture mère ;
- la manipulation d'une et une seule lignée de cellules à la fois ;
- le maintien en parallèle de 2 ou 3 séries de culture ;
- le contrôle régulier de l'absence de contamination mycoplasmaïque.

1.2.2.2. Procédure

A partir de la banque de travail, prendre deux boîtes de roux de 175 cm² dans un lot. Faire un pool et ensemer de façon homogène quatre boîtes. Constituer quatre lots avec les différents types d'eau (ER, ED, ERD, EDD).

Effectuer plusieurs passages successifs, en utilisant pour chaque lot la même eau initiale. Faire des observations au microscope inversé, et photographier les résultats. Le tapis monocellulaire est confluent généralement au bout de 3 à 4 jours. Après plusieurs passages, prendre deux boîtes de chaque lot et procéder à la numération cellulaire.

1.2.3. Traitement statistique des données

- Logiciel de saisie des données : Excel 2013
- Logiciel d'analyse statistique : Minitab version 14
- Analyse descriptive : Moyenne, variance avec intervalle de confiance à 95% et risque alpha à 5%
- Variables qualitatives : Comparées par le test Anova GLM
- Seuil de signification : 0,05

CHAPITRE II : Résultats

2.1. Analyse des données

Les résultats de l'analyse de la variance, montrent que les échantillons suivent une loi normale. La valeur de P –value < 0.05 ; on conclut que la différence des moyennes entre les deux échantillons d'eau est hautement significative (Figure 9).

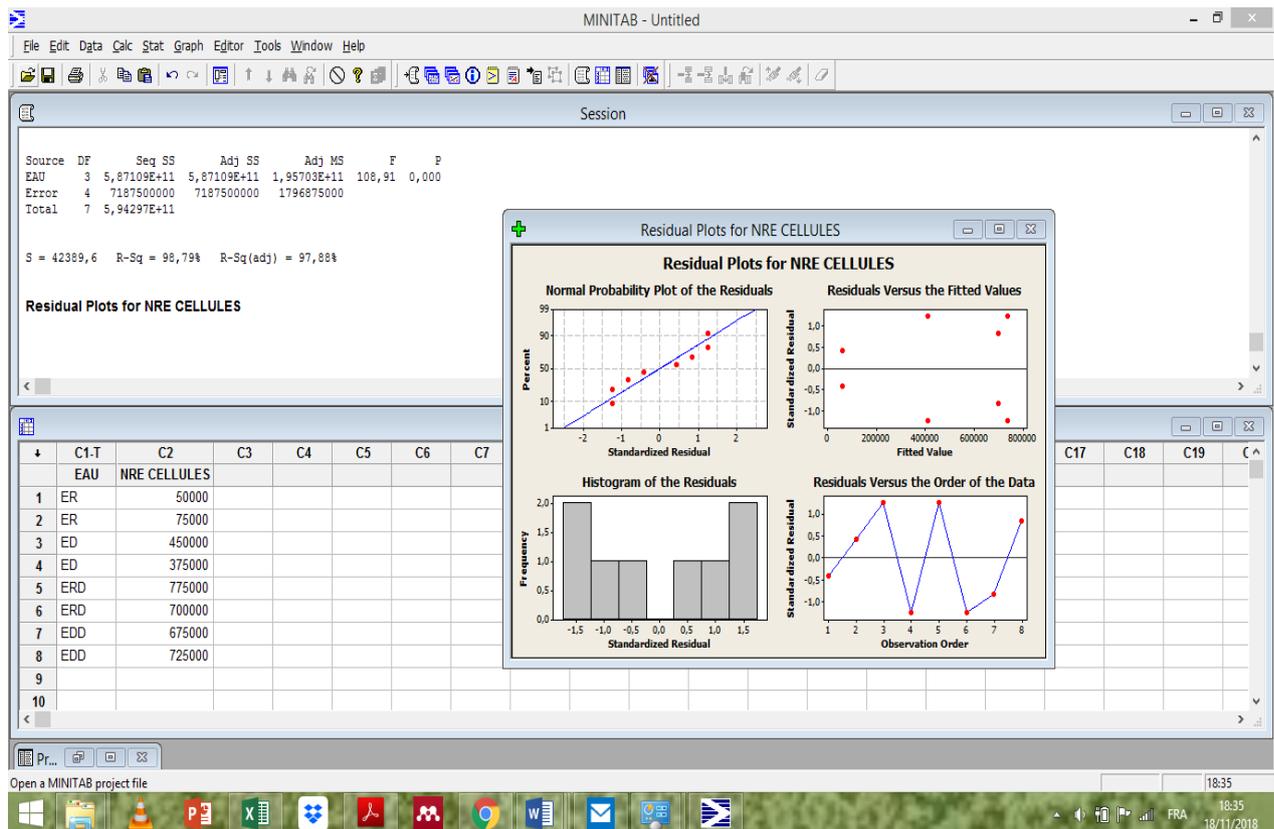


Figure 9 : Analyse de la variance par la méthode Anova GLM

2.1.1. Analyse microbiologique des échantillons d'eau

Il ressort de l'analyse microbiologique des différents échantillons d'eau (ER, ED, ERD, EDD) effectuée par le Laboratoire National de Santé Publique et d'expertise (LANSPEX) ; qu'ils sont exempts de germes, tels que : flore aérobie mésophile ; *E. coli* ; les coliformes totaux ; les salmonelles ; les streptocoques fécaux et les anaérobies sulfite-réducteurs.

2.1.2. Analyse physico chimique des échantillons d'eau

D'après les analyses physico-chimiques menées au LANSPEX, la différence essentielle entre ces quatre types d'eau, réside au niveau de la conductivité qui est une conséquence de la teneur en éléments minéraux. L'eau du robinet (ER), et l'eau minérale Dallol (ED) n'ayant pas subi de traitement (distillation), ont une forte teneur en ces sels minéraux. En effet, au niveau du calcium, pour ER, la teneur est de 10 mg/l ; elle est de 2 mg/l pour ERD ; donc 5 fois plus élevée. Pour le CaCO₃, le rapport est presque de 10 fois plus élevé pour ER par rapport à EDR, et 12 fois plus élevé pour ED par rapport à EDD (Tableau IX).

Tableau IX : Synthèse des résultats de l'analyse physico chimique des échantillons d'eau effectuée au LANSPEX

Mg/l	ER	ED	ERD	EDD	Normes OMS (mg/l)
Sodium	7	6	3	< 1	≤ 200
Potassium	4	3	< 1	< 1	≤ 12
Calcium	10	7	2	1	≤ 200
Magnésium	1	2	0	0	≤ 50
dureté (CaCO ₃)	29	26	3	2	≤ 200 mg/l de CaCO ₃
Chlorures	8.9	7	3.5	4	≤ 250
Fluorures	0.13	0.2	0.08	0.0	≤ 1.5
Nitrates	< 0.1	6	< 0.1	< 0.1	≤ 50
Nitrites	0.0	0.0	< 0.002	0.0	≤ 3
Chlore libre	< 0.02	0.0	< 0.02	< 0.02	-
PH	7.1	6.8	6.8	7.2	6.5 – 8.5
Sulfates	15	< 2	0	0	≤ 250
Fer	0.0	0.1	< 2	< 2	≤ 0.3
Chlore total	0.0	0.0	0.0	0.0	-
Conductivité (µs / cm)	99	77	< 0.02	0.0	-
Turbidité (unité formazine)	0	0	0	0	≤ 25

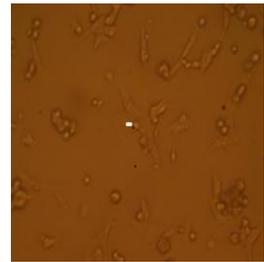
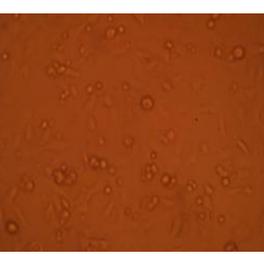
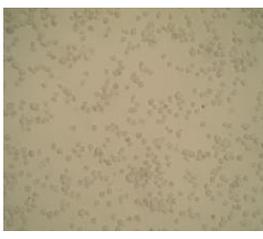
ER : eau du robinet
ED : eau minérale Dallol

ERD : eau du robinet distillée
EDD : eau Dallol distillée

2.2. Résultats obtenus sur le rendement en cellules

Les résultats obtenus au LABOCEL, nous permettent de constater après comptage cellulaire d'échantillons pris au hasard, que les rendements en termes de croissance cellulaire et doses de vaccins sont nettement plus élevés quand les différentes eaux subissent un traitement (distillation). Les résultats sont répertoriés dans le tableau X.

Tableau X : Résultats obtenus sur le rendement des cellules en fonction des échantillons d'eau

	ER	ED	ERD	EDD
T0				
T1				
Aspect après trypsination				
concentration des cellules vivantes/ ml (moyenne arithmétique)	62 500	412 500	737 500	700 000
doses de vaccins pour 1 l	6 943	45 833	81 943	77 777
doses de vaccins pour 10l	69 433	458 333	819 433	777 767
doses de vaccins pour 20l	138 867	916 667	1 638 867	1 555 533

T0 : 1^{er} jour ensemencement

T1 : T0+4jour

Après distillation de ces mêmes eaux ; on obtient un rendement nettement meilleur, et une meilleure prolifération des cellules Vero. L'observation des cultures au microscope (Tableau IX) montre que les cellules des flacons ERD et EDD présentent une meilleure morphologie, un bon aspect et paraissent normales par rapport à celles des flacons ED et surtout ER ; qui présentent la plus grande conductivité. Ces dernières présentent une morphologie filiforme et anormale.

Chapitre III : Discussion

Au terme de l'étude menée au LABOCEL ; nous avons obtenu comme résultats en terme de rendement des cellules : ER : 62.500 cellules /ml ; ED : 412.000 cellules /ml ; ERD : 737.500 cellules /ml ; EDD : 700.000 cellules /ml.

Il a été constaté que la densité en terme de rendement des cultures de cellules « Vero » diffère en fonction de l'eau utilisée pour la préparation des milieux de cultures, selon qu'elle ait subi un traitement (distillation), ou non.

Le paramètre pH ne sera pas pris en compte dans cette étude, car il sera ajusté à 7,2 lors de la préparation de chaque milieu de culture. De même, pour le paramètre contamination microbienne, puisque les analyses révèlent l'absence des germes.

Le paramètre prédominant, qui a pu avoir une influence sur les cultures cellulaires reste la teneur en sels minéraux qui traduisent la conductivité. Cette dernière est très élevée au niveau de ER et ED ; les échantillons n'ayant pas subi de traitement, avec respectivement une valeur de 99 $\mu\text{s} / \text{cm}$ et 77 $\mu\text{s} / \text{cm}$. Pour les mêmes échantillons ayant subi la distillation ; elle est quasiment nulle.

Les niveaux de contaminants ioniques, en particulier les ions multivalents et les métaux lourds, doivent être maintenus bas dans l'eau utilisée pour les cultures cellulaires. Les métaux lourds - par exemple, mercure et plomb - sont connus pour être cytotoxiques (OLIVIERI, et al., 2000). Une haute concentration ionique (conductivité), peut affecter l'activité enzymatique. Certains ions peuvent interférer avec la croissance cellulaire ou conduire à une apoptose. Les composés de carbone organique total (COT) peuvent quant à eux influencer sur la croissance cellulaire (DELISLE, 2011).

Donc nous pouvons déduire de notre étude, que la haute conductivité due à la quantité élevée d'ions au niveau de ER et ED ; a eu une influence négative sur la croissance cellulaire, soit en bloquant les activités enzymatiques, soit en conduisant les cellules à une apoptose ou nécrose par cytotoxicité. D'autant plus que ces éléments minéraux sont présents dans les différentes formulations de milieu de culture.

Une étude similaire a comparé des types d'eau pour cultiver des cellules PER.C6 EpCAM dans des milieux CDM4PerMab (Hyclone) prêts à l'emploi, utilisés comme témoins, ainsi que dans des milieux en poudre CDM4PERMab (Hyclone) préparés avec de l'eau ultrapure obtenue avec de l'eau Arium® pro UF et de l'eau RO, respectivement à des fins de test (GROSMAN 2004) . Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de roux 175Cm² et dans des flacons rotatifs.

Les résultats obtenus sont respectivement :

- Dans les boîtes de roux : $1,56 \cdot 10^6$ cellules / ml pour le témoin ; $1,73 \cdot 10^6$ cellules / ml pour le milieu reconstitué par l'eau Arium® et, $1,68 \cdot 10^6$ cellules / ml avec l'eau ayant subi une osmose inverse.
- Dans les flacons rotatifs : $5,42 \cdot 10^6$ cellules / ml pour le témoin ; $6,24 \cdot 10^6$ cellules / ml pour le milieu reconstitué par l'eau Arium® et, $4,6 \cdot 10^6$ cellules / ml avec l'eau ayant subi une osmose inverse.

Un examen microscopique des cellules dans les flacons rotatifs a indiqué que les cellules cultivées dans un milieu reconstitué avec de l'eau RO semblaient malsaines par rapport aux cellules cultivées dans un milieu prêt à l'emploi et reconstituées avec de l'eau purifiée par le système Arium® pro UF.

Dans les flacons rotatifs, l'effet de concentrations plus élevées d'endotoxines et de sels inorganiques dans un milieu reconstitué avec de l'eau RO entraîne une vitesse de croissance réduite (densité cellulaire et viabilité inférieures) par rapport aux valeurs obtenues pour les témoins (prêts à l'emploi) ou pour les échantillons dans un milieu reconstitué avec de l'eau ultrapure Arium®. Ces résultats sont confirmés par les expériences de production d'anticorps. La production d'anticorps dans des flacons rotatifs de cellules cultivées dans un milieu reconstitué avec de l'eau ultrapure obtenue à partir du système Arium® pro UF était de 0,84 mg / ml (exemple au jour 8) et était donc supérieure aux valeurs obtenues pour la production d'anticorps avec le fabricant des milieux prêts à l'emploi en tant que témoins (0,71 mg / ml) ou dans les échantillons reconstitués avec de l'eau RO (0,42 mg / ml).

Nous concluons donc que la concentration plus élevée d'endotoxines ou de sels inorganiques dans l'eau RO a entraîné cette diminution de la croissance. Par conséquent, l'eau du système Arium® pro UF convient parfaitement à la culture de cellules PER.C6 EpCAM car ce système d'eau minimise la teneur en impuretés, telles que les ions inorganiques, les composés organiques et, en particulier, les endotoxines à un niveau exceptionnellement bas, comme cela a été récemment confirmé par de nouvelles expériences (SCHMIDTS, et al., 2012).

C'est ce qui est également ressorti de notre étude où, la différence essentielle entre les échantillons d'eau est la teneur en ions inorganiques, qui a dû entraîner une baisse de croissance au niveau des échantillons ER et ED.

Chapitre IV : Recommandations

A la suite de notre étude, nous avons constaté que l'eau utilisée pour la préparation des milieux joue un rôle très important, voir primordial dans les cultures des cellules animales.

C'est pourquoi nous formulons quelques recommandations qui suivent :

4.1. Au LABOCEL

- Utiliser pour les différents processus de production de vaccins ; l'eau de qualité type I
- Pour la verrerie, utiliser l'eau de type III ; mais toujours effectuer le dernier rinçage avec de l'eau de qualité type II

4.2. Aux chercheurs

Proposer et aider le LABOCEL à établir un dispositif qui répond aux critères de préparation et de pureté pour l'eau. Par exemple un dispositif de préparation de l'eau de type I, comme décrit par le NCCLS.

4.3. A l'Etat

Octroyer un financement sous forme de subvention au LABOCEL ; afin de permettre à cette institution de changer son plateau technique et de former le personnel.

CONCLUSION

Ces dernières décennies, la lignée cellulaire Vero a massivement été utilisée par de nombreux laboratoires pour permettre la production de vaccins à des échelles importantes. A des fins d'optimisation, il est donc particulièrement utile de connaître les spécificités de culture, ainsi que d'avoir un aperçu juste du métabolisme de cette lignée.

L'objectif de ce travail était de contribuer à optimiser la production de vaccin sur cellules « VERO » au LABOCEL. L'amélioration de la qualité de l'eau servant à la préparation des milieux de culture devrait permettre d'augmenter le volume en terme de rendement du lot de vaccin et de réduire le temps et le coût de production.

Les résultats obtenus étaient au-delà des attentes surtout pour l'échantillon d'eau du robinet (ER). En effet, après distillation, on obtient un rendement 12 fois plus élevé. Ceci du fait que la conductivité de l'eau est nettement réduite ; quasiment nulle grâce à l'élimination des sels minéraux. Donc, le traitement a été très significatif quant à l'amélioration du procédé de culture des cellules Vero.

L'utilisation de l'eau de qualité Type I, doit être respectée rigoureusement tout au long du processus de production, et pour la verrerie utiliser au moins l'eau de type II au dernier rinçage. Le respect des différentes recommandations doivent amener le LABOCEL à optimiser encore plus la production des vaccins sur cellules Vero, et aussi bien la validation de diverses tests d'analyse biologique, ce qui contribuera de façon indirecte à une amélioration de la protection de la santé animale.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- BARBOUCHE, N. 2008.** Étude de la réponse physiologique de cellules animales à des stress hydrodynamiques contrôlés : *Th Doctorat, INPL, Nancy*. 2008. pp. 15-101
- BARLOVATZ, MEIMON, Georgia et ADOLPHE, Monique. 2003.** Cultures de cellules animales, Méthodologies - Applications : (*Paris: Editions INSERM*)., 2003. p. 196.
- BROU, M PAul R.Jr. 2012.** Culture de cellules animales dans l'industrie pharmaceutique: production de protéines thérapeutiques d'une petite échelle a une échelle industrielle. Thèse Docteur en Pharmacie : *Université Claude Bernard - Lyon 1 Faculté De Pharmacie Institut Des Sciences Pharmaceutiques Et Biologiques*. 2012. 65, pp. 0–160.
- CEZARD, F. 2013.** Milieux et matériels de culture cellulaire . *27 fiches.2 éd. DUNOD, Paris*. 2013. pp. 5 -11 .
- CHAUDHRY, MA, Bowen, BD et Piret, JM. 2009.** Culture pH and osmolality influence proliferation and embryoid body yields of murine embryonic stem cells :*Biochemical Engineering Journal.*, 45, (2):. 2009. pp. 126- 135.
- CHERLET, M et Marc, A. 1999.** Hybridoma cell behaviour in continuous culture under hyperosmotic stress : *Cytotechnology.*, 29, (1):. 1999. pp. 71- 84.
- DUCOMMUN, P, et al. 2002.** Monitoring of temperature effects on animal cell metabolism in a packed bed process : *Biotechnol. Bioeng* , 77(7). 2002. pp. 838-842.
- DUIGOU, A. 2010.** Maîtrise des procédés de culture cellulaire pour la production de vaccins :*Université Henri Poincaré - Nancy 1, Faculté De Pharmacie*. Thèse Docteur en pharmacie. 2010. pp. 1-160.
- FAO. 2003.** Production et Contrôle de la Qualité du vaccin homologué atténué de la peste des petits ruminants. 2003. pp. 21-23.
- JEANNESSON , Elise. 2007.** Profils génétiques de lignées cellulaires humaines modèles en physiopathologie et pharmacotoxicologie cardio-vasculaires: *Université Henri Poincaré - Nancy 1, Faculté De Pharmacie : T /PH/N/2007/207D*. Thèse de Docteur en Pharmacie. 2007. pp. 15 - 71.
- JULIETTE, Dupont-Monod. 2014.** Etablissement et exploitation d'une lignée cellulaire de gliome canin pour la recherche thérapeutique. *Université claud-bernard - lyon I, vetagro sup. Thèse n° 027*. 2014. p. 191

- KALLOS, S., M. et Behie, L. A. 1999.** Inoculation and Growth Conditions for High-Cell-Density Expansion of Mammalian Neural Stem Cells in Suspension Bioreactors." *Biotechnology and Bioengineering* 63(4). 1999. pp. 473-483
- MACLEOD, K. G. & LANGDON, S. P. 2004.** Essential Techniques of Cancer Cell Culture. In: *LANGDON S.P. (ed), Methods in Molecular Medicine, vol. 88: Cancer Cell culture : Methods and protocols.* Human Press Inc, Totowa. 2004. pp. 17 - 29.
- MASSIP, P. 2002.** Vaccinations : bases immunologiques, indications, efficacité, complications: *medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/MODULE7/item85*. 2002. pp. 1-14.
- MONTAGNON, J., et al. 1981.** "Comparison of sensitivity of VERO cell line versus primary monkey kidney cells in the detection of residual live polio virus during and after inactivation." *Developments in biological standardization* 47:. 1981. pp. 151-156.
- NCCLS. 1997.** Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory : *Approved guideline. Third Edition. C3-A3 : 17 (18).* NCCLS. West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA. 1997. p. 1997.
- NIGER. 2015.** Ministère de l'Élevage ., document de Strategie de Developpement Durable de L'Élevage : *SDDL (2013 -2035)*. 2015. pp. 1-74.
- . **2010.** Ministère de l'élevage : Révue du secteur de l'élevage au Niger , *Rapport provisoire : FAO/SFW*. 2010. p. 16.
- . **2014.** Ministère du Plan, de l'Amenagement du Territoire et du Developpement Communautaire , *Institut Nationale de la Statistique : Le Niger en chiffre*. 2014. p. 47.
- NIGER, Ministère de l'Agriculture et de l'Élevage. 2016.** Plan d'Actions Stratégique du Laboratoire Central de l'Élevage (LABOCEL). 2016. p. 19.
- NOLL, T, et al. 2002.** Cultivation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: Biochemical Engineering Aspects : " *Adv Biochem Eng Biotechnol* 74. 2002. pp. 111-128.
- OLIVIERI, G., Brack, C. et Müller-Spahn, F., Stähelin, H.B., Herrmann, M., Renard, P., Brockhaus, M., Hock, C. 2000.** Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* 74(1):231-6. 2000.
- PETIOT, E. 2009.** Etude et optimisation de procédés de production de vaccins par cultures de cellules animales en bioréacteurs: *Th Doctorat, INPL, Nancy*. 2009. pp. 9-19.

QUINTIN-COLONNA. 2007. La physiologie de la réponse immunitaire. *ENV Alfort, Unité Pédagogique de Microbiologie et Immunologie.* 2007. p. 23.

SAITO, M., et al. 1981. "Recovery of cell-free varicella virus from Vero cells." *Archives of Virology* 68 (1):. 1981. pp. 59-63.

SCHMIDTS, K et Herbig, E. 2012. "Weniger ist mehr - Endotoxine quantitative optimisée par Reinstwasser", *Laborpraxis*, 5, 36. Jhg. 2012.

SHIMIZU, B. 1993. Manual of selected cultured cell lines for bioscience and biotechnology, *Tokyo : Kyoritsu Shuppan.* pp. 299–300. ISBN 4-320-05386-9. 1993. pp. 299–300 .

SOUZA, M., Freire, M. and Castilho, L. 2007. Cultivation of Vero Cells on Microporous and Macroporous Microcarriers. *Cell Technology for Cell Products. Smith, R. Harrogate, UK .* 2007. pp. 753-755.

WHITE, L. and Ades, E. 1990. "Growth of Vero E-6 cells on microcarriers in a cell bioreactor." *Journal of clinical microbiology* 28 (2): . 1990. pp. 283 - 286.

YASUMURA, Y et M, Kawakita. 1963. The research for the SV40 by means of tissue culture technique », *Nippon Rinsho vol. 21, no 6,*. 1963. pp. 1201–1219.

WEBOGRAPHIE

- ATLAS, 2018.** Niger – PopulationData.net. Atlas des populations et pays du monde. Available at: <https://www.populationdata.net/pays/niger/> [Accessed November 29, 2018].
- BOQUEL, F., GONCALVES, V. & OGER, C., 2013.** La vaccination - XXème - XXIème siècle - Développement de différents types de vaccins (2). Available at: http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/Concours/2013_Angers_Oger_Goncalves_Boquel_Vaccination/co/hist_def3.html [Accessed November 2, 2017].
- CHELLI, A., 2013.** Cours de Biologie Cellulaire CHAPITRE V: ETUDE DES ORGANITES CELLULAIRES Cours de Biologie Cellulaire. *1ère Année LMD FSNV*, pp.1–17. Available at: <https://harzouzlaurencoursst2s.skyrock.com/3148490282-Pole-1-Chapitre-3-Les-cellules-animales-structures-et-ultra-structures.html> [Accessed December 27, 2018]
- CRETOT, P., 2013.** La vaccination comme moyen de prévention : analyse bénéfices-risques, comparaison des politiques vaccinales en Europe, freins et rôle du pharmacien d'officine. *Université de Lorraine*, p.168. Available at: http://docnum.univ-lorraine.fr/public/BUPHA_T_2013_CRETOT_PAUL.pdf
- CURTIS, V., 2015.** Freins et déterminants à la vaccination par les médecins généralistes. , (*Paris 6*), p.9. Available at: http://www.sfm.org/data/generateur/generateur_fiche/971/fichier_these_valentine34c3a.pdf [Accessed November 1, 2017].
- DELISLE, C., 2011.** Des contrôles qualité à tous les stades de fabrication des vaccins vétérinaires. Available at: <http://www.pleinchamp.com/elevage/bovins-viande/actualites/des-contrôles-qualite-a-tous-les-stades-de-fabrication-des-vaccins-veterinaires> [Accessed November 28, 2018].
- PEDEUTOUR, Florence 2009.** Techniques de Culture Cellulaire Appliquées A La Cytogénétique - ppt video online télécharger. *Faculté de Médecine de Nice*. Available at: <https://slideplayer.fr/slide/10276987/> [Accessed December 6, 2018].
- G.KRETZMER, 2002.** Industrial processes with animal cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2–3), pp.135–142. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-002-0991-y> [Accessed March 13, 2017].
- GEORGIA, B.-M. & Xavier, R., 2014.** Culture de cellules animales (3^e éd.), Available at: <http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/bcm/TP/CultureCellulaireAnimale.pd> [Accessed November 29, 2018].
- GOOGLE, 2017.** cellule animale 3D+qqqs organites.jpg (1000×493). Available at: http://imagesbiogeolfxm.free.fr/cellule/original/cellule_animale_3D+qqqs_organites.jpg [Accessed December 10, 2017].
- GROSMAN, Z., 2004.** Water is Life - Water supertankers. *Water Supertankers*, 16 (September), p.22.

Available at: <http://academic.evergreen.edu/g/grossmaz/SIMHONM/> [Accessed October 10, 2018].

HARZOUZ Lauren, 2017. Pôle 1 : Chapitre 3 : Les cellules animales : structures et ultra-structures - Mise à jour de tout les cours ^^ et un autre... Available at: <https://harzouzlaurencoursst2s.skyrock.com/3148490282-Pole-1-Chapitre-3-Les-cellules-animales-structures-et-ultra-structures.html> [Accessed December 30, 2018]

KASTAN, M.B. & BARTEK, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), pp.316–323. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549093> [Accessed February 27, 2017].

LANGDON, S.P., 2004. Culture Basic Principles of Cancer. , pp.33–42. Available at: https://www.mendeley.com/research-papers/culturebasic-principles-cancer-cell-culturebasic-principles-cancer-cell-culture-basic-principles-can/?utm_source=desktop&utm_medium=1.16.3&utm_campaign=open_catalog&userDocumentId=%7B957f7b09-e8d5-4596-aa4c-50a2bf1 [Accessed March 7, 2017].

LUC.Massicotte, S.L., 2002. Qualité de l'eau de laboratoire. *Institut National de Santé Publique du Québec*, p.2. Available at: (<HTTP://WWW.SANTECOM.QC.CA>)

MARC, A. & OLMOS, É., 2010. Procédés de culture en masse de cellules animales. Techniques de l'ingénieur Production des médicaments, *base docum (ref. article : bio6800)*. Available at: <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/production-des-medicaments-42610210/procedes-de-culture-en-masse-de-cellules-animales-bio6800/> [Accessed September 11, 2017].

MIK-MAG, 2018. Globules rouges et étalonnage - - Accessoires du Microscope - Mikroskopia. Google. Available at: <http://forum.mikroskopia.com/topic/1851-globules-rouges-et-etallonnage/> [Accessed November 29, 2018].

OGER, C., BOQUEL, F. & GONCALVES, V., 2013. Historique – Définitions HISTORIQUE- ,p.3. Available at: http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/Concours/2013_Angers_Oger_Goncalves_Boquel_Vaccination/res/hist_def.pdf [Accessed October 27, 2017].

UNISCIEL, 2018. Partie 1 : Structure, fonction et métabolisme de la cellule - II - Transmission de l'information génétique au cours d'une division cellulaire. Google. Available at: http://ressources.unisciel.fr/DAEU-biologie/P1/co/P1_chap2_c2.html [Accessed November 25, 2018].

WILLIAMS, G.H. & STOEBER, K., 2012. The cell cycle and cancer. *Journal of Pathology*, 226(2), pp.352–364. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21990031> [Accessed February 27, 2017].

ANNEXE

ANNEXE I: Milieu de croissance

Eagle's Minimum essential Medium, Glasgow modification-GMEM

Ce milieu est le milieu Minimum essentiel d'Eagle ou MEM (Eagle H.) supplémenté avec le sérum de veau fœtal (entre 5 à 10%) et le bouillon tryptose phosphate (entre 10 et 14%).

Composition par litre de milieu:

MEM poudre	13,3 g
Sérum fœtal	30 ml
Sérum de veau.....	70 ml
TPB	3 g
Bicarbonate de sodium	22 g
Mycostatine.....	1 ml
Antibiotique.....	2 ml
Eau distillée	900 ml
Ajuster le pH 7.2 - 7.4	

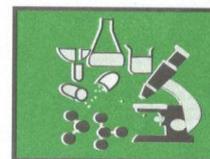
ANNEXE II : Solution de Trypsine versene pour les subcultures

Composition

NACL	8 g
KCL	0,4 g
Glucose	1 g
NAHCO ₃	0,58 g
Trypsin 250	1 g
Versene EDTA	0,4 g
Rouge de phénol	0,01 g
Antibiotique	2ml
Eau distillée	1000 ml

ANNEXE III : Résultats obtenus au LANSPEX pour l'analyse physico-chimique

RÉPUBLIQUE DU NIGER
 MINISTÈRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE
 LABORATOIRE NATIONAL DE SANTÉ
 PUBLIQUE ET D'EXPERTISE (LANSPEX)
 NIF: 5783



Etablissement Public à Caractère Administratif

(LANSPEX)

Niamey, le 31 Mai 2016

RAPPORT D'ESSAIS N° : 0630/EA/16/SPC

Analyses physico-chimiques d'un (01) échantillon d'eau de robinet

Code interne de l'échantillon : **0630/EA/16**
 Code indiqué : ER
 Date de réception de l'échantillon : 19/05/16 Date du début des essais : 27/05/16
 Adresse complète du client : PPAO, BP : 10037, Niamey, Niger
 Référence de la demande: **V/B.C. n°0732 du 03/05/16**

DETERMINATIONS	REF. METHODES	RESULTATS	NORMES OMS
Sodium (mg/l)	NF T 90019	7	≤ 200 mg/l
Potassium (mg/l)		4	≤ 12 mg/l
Calcium (mg/l)	RODIER éd. 9	10	≤ 200 mg/l
Magnésium (mg/l)		1	≤ 50 mg/l
Dureté (mg/l de CaCO ₃)		29	≤ 200 mg/l de CaCO ₃
Chlorures (mg/l)		8,9	≤ 250 mg/l
Fluorures (mg/l)	Spectrophotométrie	0,13	≤ 1,5 mg/l
Nitrates (mg/l)		< 0,1	≤ 50 mg/l
Nitrites (mg/l)		0,0	≤ 3mg/l
Chlore libre (mg/l)		< 0,02	-
pH	pH-mètre	7,1	6,5 - 8,5
Sulfates (mg/l)	Spectrophotométrie	15	≤ 250 mg/l
Fer (mg/l)		0,0	≤ 0,3 mg/l
Chlore total (mg/l)		0,0	-
Conductivité (µs/cm)	Conductimètre	99	-
Turbidité (Unité Formazine)	Turbidimètre	0	≤ 25 Unité Formazine

NB : Echantillonnage et prélèvement par vos soins.

LE CHEF DU SERVICE PHYSICO-CHIMIE

M. Abdou Aboubacar
 Le
 Chef de Service
 Physico-Chimie

M. ABDOU Aboubacar

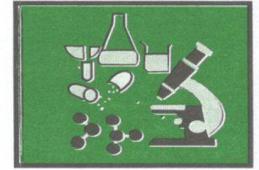
LE DIRECTEUR GENERAL

Dr. IDRISSA Issiaka
 LANSPEX
 LE DIRECTEUR
 GENERAL
 MINISTÈRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

Dr. IDRISSA Issiaka

Ce rapport d'essai est valable uniquement pour le(s) échantillon(s) qui y sont mentionnés. Sa reproduction n'est autorisée que sous sa forme intégrale.
 ENR510001.00 Date d'application : 09/04/16 Page 1 sur 2

BP.: 10.465 Niamey - Tél.: (227) 20 74 28 29 - Fax : (227) 20 74 22 57 - E-mail : lanspex@intnet.ne



Niamey, le 31 Mai 2016

RAPPORT D'ESSAIS N° : 0631/EA/16/SPC

Analyses physico-chimiques d'un (01) échantillon d'eau minérale

Code interne de l'échantillon : **0631/EA/16**
 Nom commercial de l'échantillon : DALLOL
 Date de réception de l'échantillon : 19/05/16 Date du début des essais : 24/05/16
 Adresse complète du client : PPAAO, **BP : 10037, Niamey, Niger**
 Référence de la demande: **V/B.C. n°0732 du 03/05/16**

DETERMINATIONS	REF. METHODES	RESULTATS	NORMES OMS
Sodium (mg/l)	NF T 90019	6	≤ 200 mg/l
Potassium (mg/l)		3	≤ 12 mg/l
Calcium (mg/l)	RODIER éd. 9	7	≤ 200 mg/l
Magnésium (mg/l)		2	≤ 50 mg/l
Dureté (mg/l de CaCO ₃)		26	≤ 200 mg/l de CaCO ₃
Chlorures (mg/l)		7	≤ 250 mg/l
Fluorures (mg/l)	Spectrophotométrie	0,2	≤ 1,5 mg/l
Nitrates (mg/l)		6	≤ 50 mg/l
Nitrites (mg/l)		0,0	≤ 3mg/l
Chlore libre (mg/l)		0,0	-
pH	pH-mètre	6,8	6,5 - 8,5
Sulfates (mg/l)	Spectrophotométrie	< 2	≤ 250 mg/l
Fer (mg/l)		0,1	≤ 0,3 mg/l
Chlore total (mg/l)		0,0	-
Conductivité (µs/cm)	Conductimètre	77	-
Turbidité (Unité Formazine)	Turbidimètre	0	≤ 25 Unité Formazine

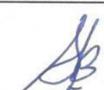
NB : Echantillonnage et prélèvement par vos soins.

LE CHEF DU SERVICE PHYSICO-CHIMIE



M. ABDOU Aboubacar

LE DIRECTEUR GENERAL



Dr. IDRISSE Issiaka

Ce rapport d'essai est valable uniquement pour le(s) échantillon(s) qui y sont mentionnés. Sa reproduction n'est autorisée que sous sa forme intégrale.

ENR510001.00 Date d'application : 09/04/16

Page 1 sur 1



Niamey, le 26 Mai 2016

RAPPORT D'ESSAIS N° : 0629/EA/16/SPC

Analyses physico-chimiques d'un (01) échantillon d'eau de robinet distillée

Code interne de l'échantillon : **0629/EA/16**
 Code indiqué de l'échantillon: ERD
 Date de réception de l'échantillon : 19/05/16 Date du début des essais : 24/05/16
 Adresse complète du client : PPAO, BP : 10037, Niamey, Niger
 Référence de la demande: **V/B.C. n°0732 du 03/05/16**

DETERMINATIONS	METHODES	RESULTATS
Sodium (mg/l)	NF T 90019	3
Potassium (mg/l)	NF T 90019	< 1
Calcium (mg/l)	Titrimétrie EDTA RODIER éd. 9 pg.249	2
Magnésium (mg/l)	Titrimétrie EDTA RODIER éd. 9 pg.249	0
Dureté (mg/l de CaCO ₃)	Titrimétrie EDTA RODIER éd. 9 pg.249	3
Chlorures (mg/l)	Méthode de Mohr RODIER éd. 9 pg.257	3,5
Fluorures (mg/l)	Spectrophotométrie	0,08
Nitrates (mg/l)	Spectrophotométrie	< 0,1
Nitrites (mg/l)	Spectrophotométrie	< 0,002
Chlore libre (mg/l)	Spectrophotométrie	< 0,02
pH	pH-mètre	6,8
Turbidité (Unité Formazine)	Turbidimètre	0
Sulfates (mg/l)	Spectrophotométrie	< 2
Fer (mg/l)	Spectrophotométrie	0,0
Chlore total (mg/l)	Spectrophotométrie	< 0,02
Conductivité (µs/cm)	Conductimètre	18

NB : Echantillonnage et prélèvement par vos soins.

LE CHEF DU SERVICE PHYSICO-CHIMIE


M. ABDOU Aboubacar

LE DIRECTEUR GENERAL


Dr. IDRISSE Issiaka

Ce rapport d'essai est valable uniquement pour le(s) échantillon(s) qui y sont mentionnés. Sa reproduction n'est autorisée que sous sa forme intégrale.
 ENR510001.00 Date d'application : 09/04/16 Page 1 sur 1



Niamey, le 26 Mai 2016

RAPPORT D'ESSAIS N° : 0628/EA/16/SPC

Analyses physico-chimiques d'un (01) échantillon d'eau minérale Distillée

Code interne de l'échantillon : **0628/EA/16**
 Code indiqué de l'échantillon : EDD
 Date de réception de l'échantillon : 19/05/16 Date du début des essais : 23/05/16
 Adresse complète du client : PPAAO, BP : 10037, Niamey, Niger
 Référence de la demande: **V/B.C. n°0732 du 03/05/16**

DETERMINATIONS	METHODES	RESULTATS
Sodium (mg/l)	NF T 90019	< 1
Potassium (mg/l)	NF T 90019	< 1
Calcium (mg/l)	Titrimétrie EDTA RODIER éd. 9 pg.249	1
Magnésium (mg/l)	Titrimétrie EDTA RODIER éd. 9 pg.249	0
Dureté (mg/l de CaCO ₃)	Titrimétrie EDTA RODIER éd. 9 pg.249	2
Chlorures (mg/l)	Méthode de Mohr RODIER éd. 9 pg.257	4
Fluorures (mg/l)	Spectrophotométrie	0,0
Nitrates (mg/l)	Spectrophotométrie	< 0,1
Nitrites (mg/l)	Spectrophotométrie	0,0
Chlore libre (mg/l)	Spectrophotométrie	< 0,02
pH	pH-mètre	7,2
Turbidité (Unité Formazine)	Turbidimètre	0
Sulfates (mg/l)	Spectrophotométrie	<2
Fer (mg/l)	Spectrophotométrie	0,0
Chlore total (mg/l)	Spectrophotométrie	0,0
Conductivité (µs/cm)	Conductimètre	25

NB : Echantillonnage et prélèvement par vos soins.

LE CHEF DU SERVICE PHYSICO-CHIMIE


 M. ABDOU Aboubacar
 Chef de Service
 Physico-chimie

LE DIRECTEUR GENERAL


 Dr. IDRISSA Issiaka
 LE DIRECTEUR GENERAL
 LANSPEX
 LABORATOIRE NATIONAL DE SANTÉ PUBLIQUE ET D'EXPERTISE

Ce rapport d'essai est valable uniquement pour le(s) échantillon(s) qui y sont mentionnés. Sa reproduction n'est autorisée que sous sa forme intégrale.

ENR510001.00 Date d'application : 09/04/16

Page 1 sur 1

ANNEXE IV : Résultats obtenus au LANSPEX pour l'analyse microbiologique

ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DE QUATRE (04) ECHANTILLONS D'EAU DEPOSES LE 13/07/16 (PPAAO)

Déterminations	Flore Aérobie Mésophile Totale/ ml	E.coli/ 100 ml	Coliformes totaux/ 100 ml	Salmonelles /5L	Streptocoques fécaux/100ml	Anaérobies Sulfito-Réducteurs/20 ml
Echantillons						
EDD St 0628/EA/16/BIO	absence	absence	absence	absence	absence	absence
ERD St 0629/EA/16/BIO	absence	absence	absence	absence	absence	absence
ER 0630/EA/16/BIO	absence	absence	absence	absence	absence	absence
DALLOL 0631/EA/16/BIO	absence	absence	absence	absence	absence	absence

Le Chef de Service Biologie

Mme Arzika Safia



Le Directeur Général

Dr Idrissa Issiaka



Influence de la qualité de l'eau sur culture de cellules « VERO » utilisées pour la production de vaccins viraux au laboratoire Central de l'Elevage (LABOCEL) du NIGER

Water quality influence on "VERO" cells culture used for viral vaccines production at the Central Veterinary Laboratory (LABOCEL) of NIGER

Résumé

Une étude a été menée au Laboratoire Central de L'Elevage (LABOCEL) de Niamey du 24 Juin 2016 au 30 Décembre 2016. Elle a pour but, d'identifier "la meilleure eau" en terme de qualité, pouvant servir à la préparation de milieux de culture, afin d'optimiser la production de vaccins sur cellules Vero. Pour cela, des cellules Vero furent cultivées en lots séparés avec des milieux de culture préparés avec quatre (4) types d'eau différente : ER (eau du robinet) ; ED (eau minérale Dallol) ; ERD (eau du robinet distillée) ; EDD (eau minérale Dallol distillée). ER et ED sont considérés comme les échantillons d'eau n'ayant pas subi de traitement et ERD et EDD les mêmes échantillons ayant subi une distillation. A l'issue de cette étude, nous avons obtenu, après comptage des cellules sur lame de Bauer les résultats suivants : ER : 62.500 cellules /ml ; ED : 412.000 cellules /ml ; ERD : 737.500 cellules /ml ; EDD : 700.000 cellules /ml. Le rendement en terme de croissance cellulaire est nettement plus élevé quand les différentes eaux subissent un traitement (distillation). En effet, au niveau de ER, le rendement après traitement est de presque 12 fois plus élevée ; et pour ED presque 2 fois plus élevé. Ainsi, l'amélioration de la qualité de l'eau servant à la préparation des milieux de culture au LABOCEL, devrait permettre d'augmenter le volume en termes de rendement du lot de vaccin d'au moins deux, voire trois fois ; et de réduire le temps de production. Des recommandations ont été faites pour une amélioration de la formulation de préparation des milieux de culture.

Abstract

A study was conducted at the Central Veterinary Laboratory (LABOCEL) of Niamey from 24th June 2016 to 30th December 2016. Its purpose is detecting "best water" in quality terms, which can be used for culture media preparation, in order to optimize vaccines production on Vero cells. For this, Vero cells were cultured in separate batches with culture media prepared with four (4) different types of water: ER (tap water); ED (Dallol mineral water); ERD (distilled tap water); EDD (Dallol distilled mineral water). ER and ED are considered water samples that have not been treated, and ERD and EDD the same samples that were treated (distilled). At the end of this study, we obtained following results after counting cells on Bauer's slide: ER: 62,500 cells / ml; ED: 412,000 cells / ml; ERD: 737,500 cells / ml; EDD: 700,000 cells / ml. The efficiency in terms of cell growth is significantly higher when different waters gone through treatment (distillation). Indeed, we find that for ER, efficiency after treatment is almost 12 times higher; and for ED almost 2 times higher. Recommendations have been made to improve formulation of culture media preparation.

Mots-clés : vaccin, eau, culture cellulaire, passage des cellules, cellules Vero

Keywords: vaccine, water, cell culture, cell passage, Vero cells.

Adresse : Laboratoire Central de l'Elevage, B.P. : 485.Niamey NIGER

Contact : (+227) 80 67 70 73/ 99 70 76 93 E-mail : limogenbio@outlook.fr ; issahalimatou@yahoo.fr