

Année :2022

N° : MM112022

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE **Biotechnologie Médicale**
OPTION : **Biomédicale**

Intitulé :

Isolement de l'HSV-1 et détermination de son titre infectieux sur culture cellulaire

Réalisé par :

BALLOUK Ikram

Soutenu le **25/07/2022**, devant le jury composé de :

Pr. Tarik ANNIZ, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, **Président**

Pr. Nadia TOUIL, Hôpital militaire d'instruction Mohammed V, **Encadrante**

Pr. Mouna OUADGHIRI, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, **Examinatrice**

Pr. El Mostafa BENAÏSSA, Hôpital Militaire d'instruction Mohammed V, **Examineur**

Avant-propos

*Le travail présenté dans ce projet de fin d'études est réalisé dans le cadre d'obtention du diplôme de Master de Biotechnologie Médicale, option Biomédicale, à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, sous la direction du **Pr. IBRAHIMI Azzedine**, et sous la coordination du **Pr. OUADGHIRI Mouna**.*

*Les différentes étapes expérimentales de ce projet ont été élaborées au sein de l'Unité de Culture Cellulaire de Laboratoire de Virologie, des Maladies Infectieuses et Tropicales de l'Hôpital Militaire d'Instructions Mohammed V de Rabat, sous l'encadrement du **Pr. TOUIL Nadia***

Dédicace

Je dédie ce travail comme un témoignage d'affections, de respect et d'admiration :

*A mes très chers parents, **OUHAMMI Fatima** et **BALLOUK Ali***

Pour tout l'amour dont vous m'avez entouré, pour tout ce que vous avez fait pour moi, Je ferai de mon mieux pour rester un sujet de fierté à vos yeux avec l'espoir de ne jamais vous décevoir. Que ce modeste travail, soit l'exaucement de vos vœux tant formulés et de vos prières quotidiennes.

*A mon frère **BALLOUK Mohamed***

Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me portes depuis mon enfance, Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

*A vous mes frères **BALLOUK Hicham** et **BALLOUK Abderrahim**, et à tout le reste de **la famille**, Je vous dédie ce modeste travail et je prie Dieu qu'il vous garde.*

Remerciements

Tout d'abord, Louange à Dieu le tout puissant qui m'a donné la force et la volonté d'achever ce modeste travail.

Ce travail est l'aboutissement d'un long cheminement au cours duquel j'ai bénéficié de l'encadrement, des encouragements et du soutien de plusieurs personnes, à qui je souhaite remercier.

*J'adresse mes sincères remerciements au **Pr. IBRAHIMI Azzedine** chef du laboratoire de Biotechnologie médicale à la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération et ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.*

*Je ne manquerai pas de remercier notre coordinatrice de Master, et présidente de ce mémoire, **Pr. OUADGHIRI Mouna**. Qu'elle trouve ici l'expression de mon respect.*

*Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au **Pr. TOUIL Nadia**, chef de l'Unité de la culture cellulaire au sein de l'HMIMV. Je lui suis reconnaissante pour sa contribution et pour sa sympathie. Vous trouverez ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je remercie également **Pr. BENAÏSSA El Mostafa**, Médecin Biologiste au Laboratoire de Bactériologie de l'HMIMV pour avoir accepté de lire, critiquer et instruire ce travail. Vous trouverez ici l'expression de mon infinie reconnaissance.*

*Je tiens à remercier vivement **Pr. ANNIZ Tarik** Professeur et membre du laboratoire Medbiotech au sein de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat d'avoir accepté d'examiner ce travail et de l'enrichir par ses propositions.*

*Un remerciement particulier aux doctorants **HEMLALI Mouhssine** et **RHAZZAR Zineb**. Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration.*

*Un grand merci à mes collègues, les techniciens de **l'Unité de Culture Cellulaire de Laboratoire de Virologie, Maladies Infectieuses et Tropicales de L'HMIMV**, qui m'ont apportée énormément du support, qu'il soit d'ordre technique ou moral.*

Enfin, merci à chacun qui a contribué au succès de mon stage et qui m'a aidée lors de la rédaction de ce travail.

Résumé

Titre : *Isolement de l'HSV-1 et détermination de son titre infectieux sur culture cellulaire*

Auteur : *BALLOUK Ikram*

Mots clés : *HSV-1, Cellules Vero, Culture cellulaire, Isolement de virus, Titre infectieux*

Le virus herpès simplex 1 (HSV-1) est un virus très répandu dans le monde entier dont la séroprévalence est estimée à 90% selon l'OMS et dont l'infection dans la majorité des cas est asymptomatique, mais peut avoir des manifestations cliniques très polymorphes (kératite, herpès labial, méningo-encéphalite...). C'est un virus neurotrope qui, après avoir pénétré l'organisme par une brèche cutanéomuqueuse, peut rentrer dans une phase de latence prolongée au niveau du ganglion trigéminal, rendant le traitement de ses infections symptomatique sans possibilité d'éradication virale définitive.

Même si le diagnostic des infections à HSV-1 est le plus souvent clinique, le diagnostic virologique direct par culture cellulaire garde son importance dans certaines indications spécifiques. En effet, la culture virale reste la méthode de référence pour le diagnostic direct de toutes sortes d'infections virales. Dans le cas du virus HSV-1, l'effet cytopathique de ce dernier apparaît dans les premières 24 heures, rendant sa culture plus efficace dans le sens où l'obtention du résultat est assez rapide et permet aussi une étude plus approfondie des propriétés structurales et prolifératives du virus.

La quantification des virus ou la détermination de leur titre infectieux permet de mieux comprendre l'évolutivité de certaines infections virales, et d'appréhender leur physiopathologie et leurs modes de transmission.

Dans ce travail, on vise à cultiver et produire le virus herpès simplex-1 dans des cellules VERO E6 afin de déterminer son titre infectieux tout en réalisant une évaluation des risques liées à ces pratiques par la méthode AMDEC.

Abstract

Title : *Isolation of HSV-1 and determination of its infectious titer in cell culture*

Author : *BALLOUK Ikram*

Keywords : *HSV-1, Vero cells, Cell culture, Virus isolation, Infectious tite*

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) is a very widespread virus throughout the world whose seroprevalence is estimated at 90% according to the WHO and whose infection in the majority of cases is asymptomatic, but can have clinical manifestations. very polymorphic (keratitis, herpes labialis, meningoencephalitis, etc.). It is a neurotropic virus which, after having penetrated the body through a cutaneo-mucous breach, can enter a prolonged latency phase at the level of the trigeminal ganglion, making the treatment of its infections symptomatic without the possibility of definitive viral eradication.

Even if the diagnosis of HSV-1 infections is most often clinical, direct virological diagnosis by cell culture remains important in certain specific indications. Indeed, viral culture remains the reference method for the direct diagnosis of all kinds of viral infections. In the case of the HSV-1 virus, the cytopathic effect of the latter appears in the first 24 hours, making its culture more efficient in the sense that obtaining the result is quite fast and also allows a more in-depth study of the structural properties. and proliferation of the virus.

The quantification of viruses or the determination of their infectious titer makes it possible to better understand the scalability of certain viral infections, and to understand their physiopathology and their modes of transmission.

In this work, we aim to cultivate and produce the herpes simplex-1 virus in VERO E6 cells in order to determine its infectious titer while carrying out an assessment of the risks related to these practices by the FMEA method.

ملخص

العنوان: عزل فيروس HSV-1 وتحديد عياره المعدي بواسطة زراعة الخلايا

الكاتب: بالوك إكرام

الكلمات المفتاح: HSV-1 ، خلايا VERO ، زراعة الخلايا، عزل الفيروس ، عيار معدي.

فيروس الهربس البسيط 1 (HSV-1) هو فيروس واسع الانتشار في جميع أنحاء العالم يقدر معدل انتشاره المصلي بنسبة 90 ٪ وفقاً لمنظمة الصحة العالمية والذي تكون الإصابة به في معظم الحالات بدون أعراض، ولكن يمكن أن يكون لها مظاهر سريرية. الهربس الشفوي والتهاب السحايا والدماع وما إلى ذلك). إنه فيروس موجه للأعصاب يمكنه، بعد اختراق الجسم من خلال ثقب مخاطي، أن يدخل مرحلة الكمون المطول على مستوى العقدة الثلاثية التوائم، مما يجعل علاج التهاباته عرضياً دون إمكانية القضاء النهائي على الفيروس.

حتى إذا كان تشخيص عدوى HSV-1 سريرياً في أغلب الأحيان، فإن التشخيص الفيروسي المباشر عن طريق زراعة الخلايا يظل مهماً في بعض المؤشرات المحددة. في الواقع، تظل الثقافة الفيروسية هي الطريقة المرجعية للتشخيص المباشر لجميع أنواع العدوى الفيروسية. في حالة فيروس HSV-1 ، يظهر تأثير الاعتلال الخلوي لهذا الأخير في الـ 24 ساعة الأولى ، مما يجعل ثقافته أكثر كفاءة بمعنى أن الحصول على النتيجة سريع جداً ويسمح أيضاً بدراسة أكثر تعمقاً للهيكليّة. خصائص وانتشار الفيروس.

إن القياس الكمي للفيروسات أو تحديد عيارها المعدي يجعل من الممكن فهم قابلية التوسع لبعض أنواع العدوى الفيروسية بشكل أفضل، وفهم علم وظائف الأعضاء وطرق انتقالها.

في هذا العمل، نهدف إلى زراعة وإنتاج فيروس الهربس البسيط 1 في خلايا VERO E6 من أجل تحديد عياره المعدي وإجراء تقييم للمخاطر المتعلقة بهذه الممارسات بطريقة AMDEC.

Table des matières

Avant-propos	I
Dédicace	II
Remerciements	III
Résumé.....	V
Abstract	VI
ملخص	VII
Table des matières	VIII
Liste des abréviations	X
Table des figures.....	XII
Liste des tableaux.....	XIII
Introduction Générale	1
Revue Bibliographique	3
Chapitre I : Le virus herpès simplex 1 (HSV-1)	4
I. Classification	4
II. Epidémiologie	4
III. Structure des Virions:.....	5
IV. Histoire naturelle et cycle viral :	6
V. Manifestations cliniques de l'infection à HSV-1 :	9
VI. Les antiherpétiques :.....	15
VII. Traitement:	17
Chapitre II : Généralités sur la Culture Cellulaire	19
I. Culture cellulaire:	19
II. Différentes techniques de culture cellulaire :	22

Chapitre III: Notions de base sur la Culture Virale	27
I. Principe:	27
II. Généralités sur les techniques et les étapes de la culture virale :	27
III. Avantages de la culture virale :	29
IV. Limites de la culture virale :	30
Matériel et Méthodes	32
I. Culture des cellules Vero E6	33
II. Culture virale.....	38
III. Evaluation et gestion des risques	40
Résultats et Discussion :	44
I. Culture des cellules Vero E6	45
II. Isolement du Virus Herpès Simplex-1 sur culture cellulaire :	46
III. Titrage Viral :	47
IV. Gestion des risques:	48
Conclusion et Perspective	53

Liste des abréviations

AMDEC	: Analyse des Modes de Défaillance, leurs Effets et leur Criticité
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADN-P	: Enzyme Polymérase
BSS	: Buffered Salt Solution
CMV	: Cytomegalovirus
DPBS	: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DMSO	: Dimethyl sulfoxid
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ECP	: Effet cytopathique
EBSS	: Earle's Balanced Salt Solution
EPI	: Equipement de protection individuelle
FFP2	: Filtering face piece 2
GMEM	: Glasgow's MEM
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution
HSV-1	: Herpès Simplex virus-1
HSV-2	: Herpès Simplex virus-2
HL-60	: Human leukemia cells.
IRM	: Imagerie par résonance magnétique
LCR	: Liquide céphalo-rachidien.
MEM	: Minimal Essential Medium
MEC	: Mileu d'entretien des cellules
MDCK	: Madin-Darby canine Kidney
OMS	: World Health Organization

- PBS** : Phosphate Buffered Saline
- PCR** : Polymerase Chain Reaction
- Rt-PCR** : Reverse Polymerase Chain Reaction.
- SARS-Cov**: severe acute respiratory syndrome coronavirus
- SEM** : Skin-Eyes- Mouth
- SVF** : Sérum de vœux fœtal
- Tk** : Tyrosine Kinase
- VZV** : Varicella-zoster virus

Table des figures

Figure 1: Structure du virion HSV-1	5
Figure 2: Dessin simplifié représentant la structure du virion HSV-1	6
Figure 3: Schéma montrant les étapes du cycle de réplication lytique de l'HSV-1	7
Figure 4: Schéma montrant le passage du virus HSV-1 depuis l'épithélium de la peau vers les terminaisons nerveuses périphériques	8
Figure 5: Image montrant les lésions typiques de l'herpès labial	9
Figure 6: Image d'un nouveau-né présentant des lésions évoquant un herpès néonatal (SEM)	11
Figure 7: Scanner cérébral d'un patient atteint de méningo-encéphalite à HSV-1	13
Figure 8: Image montrant un herpès génital chez la femme	15
Figure 9: Image montrant des vésicules en bouquet typiques d'un herpès génital chez l'homme	15
Figure 10: subcultivation des cellules sur des boîtes de cultures cellulaires	24
Figure 11: Numération des cellules en utilisant le Bleu de Trypan	25
Figure 12: Détection de virus respiratoires par immunofluorescence	29
Figure 13: Détection par une immunofluorescence des virus de la famille Herpesviridae	29
Figure 14: Détection des virus HSV-1 et HSV-2 par immunofluorescence	29
Figure 15: Image montrant des flasques de culture cellulaire de différentes surfaces	34
Figure 16: Image montrant le processus de trypsination	34
Figure 17: Image montrant un microscope inversé	35
Figure 18: Image montrant la solution de Trypsin/EDTA	35
Figure 19: Image représentant une hématimètre	36
Figure 20: Schéma représentant les cellules à compter sous microscope	37
Figure 21: Schéma représentant le cheminement de l'isolement de l'HSV-1	38
Figure 22: Schéma représentant la préparation d'autres passages viraux de l'HSV-1	39
Figure 23: Schéma représentant le déroulement du titrage viral de l'HSV-1	40
Figure 24: Image représentant les Cellules Vero E6 observées sous microscope avec un grossissement X10	45
Figure 25: Image représentant les Cellules Vero E6 observées sous microscope avec un grossissement plus grand	45
Figure 26: Image représentant l'ECP de l'HSV-1 sur cellules Vero E6 infectée, observé sous microscope avec un grossissement X10	46
Figure 27: Image représentant l'ECP de l'HSV-1 sur cellules Vero E6 infectées, observé sous microscope avec un grossissement plus grand	47

Liste des tableaux

Tableau I : Exemples des types de milieux de culture	20
Tableau II: Cotation des niveaux de gravité.	42
Tableau III: Cotation de la probabilité de L'occurrence.....	42
Tableau IV: Niveau de Criticité	43

Introduction Générale

Le virus herpès simplex 1 (**HSV-1**) est un virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*. Il s'agit d'un virus ubiquitaire très répandu dans le monde entier dont la séroprévalence est estimée à 90% selon l'OMS (Michael J. Bradshaw, 2016). Dans la majorité des cas, l'infection à HSV-1 est asymptomatique, mais peut parfois se manifester cliniquement par des affections le plus souvent bénignes et spontanément résolutives mais récurrentes tel que l'herpès labial ou la kératite herpétique, ou rarement graves, voire mortelles comme la méningo-encéphalite herpétique et l'herpès néonatal (Rice, 2021).

La primo-infection par le virus HSV-1 se déroule généralement lors de l'enfance et se transmet soit par des contacts rapprochés entre une personne saine et une autre durant la phase d'infection active, soit par les fluides corporels (salive, sueur, sang...). La primo-infection est majoritairement asymptomatique, l'incubation dure entre 2 et 12 jours (en moyenne 4 jours). Le germe est inoculé à travers une brèche microscopique (une abrasion par exemple) au niveau des cellules épithéliales de la peau ou les muqueuses de la région oro-labiale où il se réplique et produit des virions infectieux (Rice, 2021).

Le virus HSV-1 a un tropisme neurologique : après la primo-infection, il infecte les neurones sensitifs du ganglion trigéminal innervant l'épithélium oro-facial et l'épithélium cornéen à travers les terminaisons nerveuses périphériques situées à proximité du site de l'inoculation. Au niveau de ce ganglion, le virus rentre dans une phase de latence où il persiste sous forme d'ADN épisomal ayant une expression génétique très limitée (Elena Marcocci, Napoletani, Protto, & Kolesova, 2020).

Certains facteurs comme le stress, les traumatismes, l'immunodépression, la fièvre, et les troubles hormonaux peuvent mener à la réactivation du virus depuis sa latence, ainsi il commence à se répliquer et à libérer des virions qui vont provoquer une infection parmi celles sus-citées. Actuellement, les virologues décrivent l'HSV-1 comme facteur étiologique de la maladie d'Alzheimer, cause la plus fréquente de syndrome démentiel dans le monde. Par ailleurs, l'infection à HSV-1 favoriserait aussi l'infection HIV, mais les causes et les mécanismes de cette co-infection sont mal élucidés (Elena Marcocci, Napoletani, Protto, & Kolesova, 2020).

L'alternance dans le cycle viral de l'HSV-1 entre une phase de **réplication lytique** et une **phase de latence** explique l'impossibilité d'une éradication virale définitive.

Les antiviraux disponibles comme l'acyclovir n'agissent que sur la réplication virale et améliorent

les symptômes cliniques de l'infection. En d'autres termes, le traitement des infections herpétique est purement symptomatique, et par conséquent, la récurrence et la récurrence des manifestations cliniques liées aux multiples infections causées par l'HSV-1 est la règle tant que le virus persiste dans l'organisme. On peut dire qu'une infection par l'HSV-1 est une infection « éternelle » et « à vie », donc le meilleur traitement reste la prévention (A. Rice, 2021)

Même si le diagnostic des infections à HSV-1 est le plus souvent clinique, le diagnostic virologique direct par culture cellulaire garde toute son importance dans certaines indications très spécifiques. En effet, la culture virale reste la méthode de référence (GOLD STANDARD) pour le diagnostic direct de toutes sortes d'infections virales. Dans le cas du virus HSV-1, l'effet cytopathique apparaît dans les premières 24 heures, rendant sa culture plus efficace dans le sens où l'obtention du résultat est assez rapide et permet aussi une étude plus approfondie des propriétés structurales et prolifératives du virus (Diane S. & Christine C. , 2007)

Il est vrai que lors de ces dernières années, l'utilisation de cette méthode diagnostique a grandement régressé à cause de certaines limites, pour céder sa place à des techniques plus sophistiquées et plus adaptées à un usage de routine comme les techniques moléculaires (détection du génome par des anticorps monoclonaux) et l'amplification génique (RT-PCR). Néanmoins, la culture cellulaire possède des avantages incontournables la rendant quasi indétrônable de son titre de Gold Standard (Alexander A. , Irina V., & Dmi, 2020).

Ce présent mémoire a pour objectif d'isoler le virus HSV-1 par culture des cellules VERO E6, ainsi que la détermination de son titre infectieux et l'évaluation des risques liés à ces pratiques en utilisant la méthode AMDEC.

Revue Bibliographique

Chapitre I : Le virus herpès simplex 1 (HSV-1)

I. Classification:

La famille des *Herpesviridae* comprend plus de 100 virus, dont 8 infectent l'homme : le virus HHV-1 connu aussi sous le nom d'herpès simplex 1 (HSV-1) est responsable essentiellement d'infections bénignes de la peau et de la cornée mais pouvant aussi conduire à des infections neurologiques très graves à type d'encéphalites ou de méningo-encéphalites, le virus HHV-2 communément appelé herpès simplex 2 (HSV-2) qui est le plus souvent responsable d'ulcérations génitales sexuellement transmissibles (herpès génital), le virus HHV-3 ou virus de la varicelle et du zona (VZV), le virus HHV-4 ou Epstein-Barr Virus (EBV) agent de la mononucléose infectieuse et facteur de risque du lymphome de Burkitt, le virus HHV-5 ou cytomegalovirus (CMV), et les virus HHV-6, HHV-7 et HHV-8 (M. K. , A. N. , & S. N. , 2014).

II. Épidémiologie :

Environ 90% des individus à travers le monde sont porteurs du virus HSV-1. Aux États-Unis et en Europe, la séroprévalence de l'HSV-1 est de 65%. (5) L'âge moyen des personnes infectées est de 25 ans avec deux pics de fréquence : enfants âgés de moins de 3 ans, et les adultes de plus de 50 ans ; avec un sex-ratio de 1 (J. Bradshaw & Venkaten, 2016). Les récurrences concernent 20 à 40% des sujets infectés (Andreia, Renata Matalon , & Daniela Teixeira, 2020).

Le virus HSV-1 est l'étiologie la plus fréquente d'encéphalite sporadique avec une incidence de 2 à 4 cas par 1,000,000 habitants (J. Bradshaw & Venkaten, 2016), et il est responsable de 90% des méningo-encéphalites herpétiques. Celles-ci ont un taux de mortalité s'élevant à 70%, et un taux de séquelles neuro- sensorielles atteignant 30%. (Elena Marocci, Napoletani, Protto, & Kolesova, 2020).

L'incidence des infections oculaires herpétiques s'élève à 11,8 cas par 100,000 habitants aux États-Unis. En 2012, on a recensé 1,5 millions de cas de kératite herpétique à travers le monde, dont 40,000 cas se sont compliqués de cécité irréversible. En France, l'incidence de la kératite herpétique est aux alentours de 31,5 cas par 100,000 habitants dont 13,2 nouveaux cas et 18,3 cas de récurrences (A. , A. , S. , & D.K., 2014).

En 2016, 190 millions d'individus entre 15 et 49 ans ont un herpès génital à HSV-1 (Shuyong Zhu, 2021).

Aux États-Unis, 5,24 nouveau-nés sur 10,000 souffrent d'herpès néonatal avec une mortalité de 4% malgré le traitement antiviral, et 40% de séquelles neurologiques, psychomotrices et intellectuelles (Richard & Joel, 2022).

III. Structure des Virions:

L'HSV-1 est un virus de structure pseudo-sphérique de diamètre avoisinant 200 nm. Son génome est formé d'un ADN double brin de 152 kb pouvant coder jusqu'à 85 protéines virales. Cet ADN est protégé par trois couches :

- La couche la plus externe est l'enveloppe virale : c'est une bicouche lipidique dérivée à partir des cellules de l'hôte. Elle est composée de 17 protéines virales dont 12 glycoprotéines. Parmi ces dernières, les plus importantes sont gB, gC, gD, gH, et gL qui jouent un rôle crucial dans l'adhésion cellulaire qui précède la pénétration dans la cellule hôte (Lulia, Rahul K., & Deepak, 2019).
- La couche intermédiaire est le tégument qui comprend plus de 20 polypeptides et quelques protéines de l'hôte. Elle joue un rôle important dans l'assemblage des virions néoformés et dans la réplication virale (A. Rice, 2021).
- La couche la plus interne qui entoure le génome est la capsid icosaédrique qui comprend environ 8 protéines virales (A. Rice, 2021).

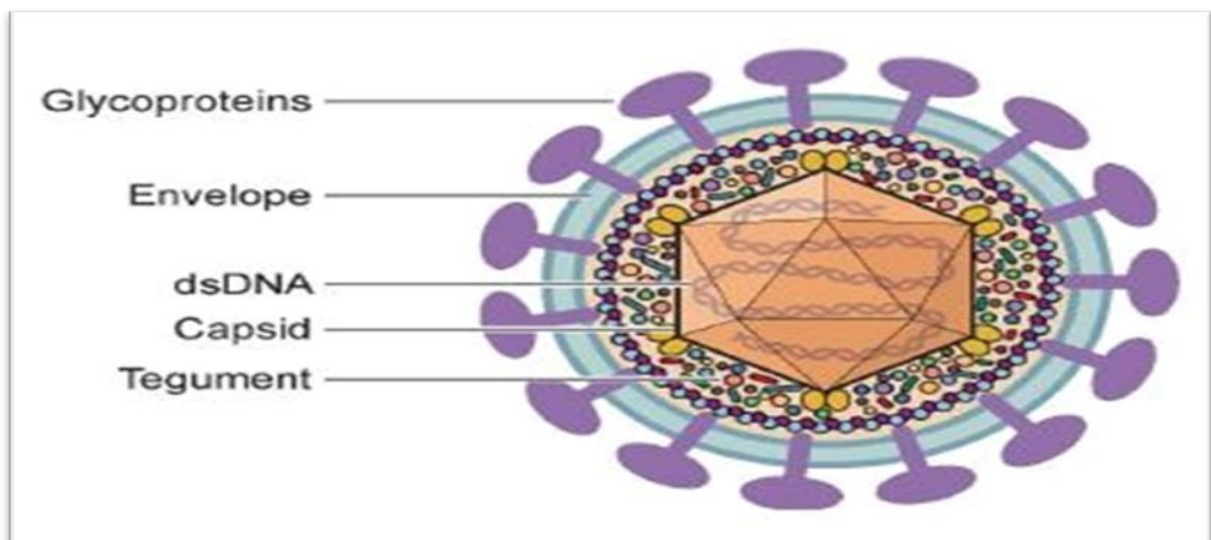


Figure 1: Structure du virion HSV-1

(Shuyong Zhu, 2021)

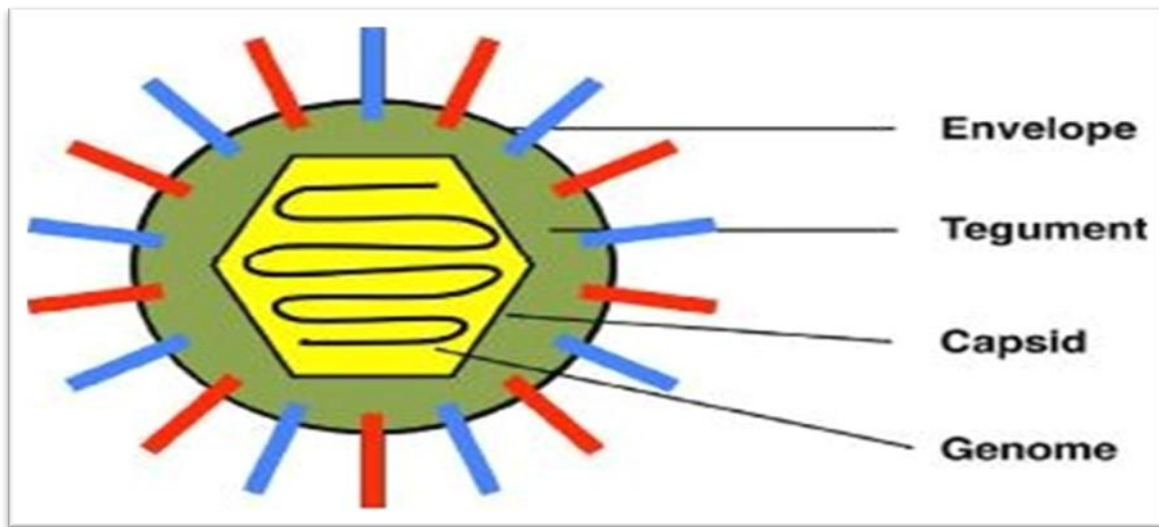


Figure 2: Dessin simplifié représentant la structure du virion HSV-1

(A. Rice, 2021)

IV. Histoire naturelle et cycle viral :

Le cycle de l'HSV-1 est formé par l'alternance de deux phases : phase de réplication lytique qui se caractérise par la production de virions infectieux au dépend de la cellule hôte et qui se concrétise par la lyse de cette dernière avec la libération des virions et l'apparition de manifestations cliniques polymorphes selon l'organe atteint (infection symptomatique durant la primo-infection ou durant la réactivation), et la phase de latence au niveau des neurones sensitifs du ganglion trigéminal qui est cliniquement asymptomatique et qui peut se terminer grâce à l'intervention de facteurs divers (stress, immunodépression...) par une réactivation endogène et un retour à la première phase de réplication lytique (Shuyong & Abel, 2021)

1. Phase de réplication lytique :

C'est la phase qui se manifeste cliniquement par une infection apparente. Elle débute par l'entrée du virus dans la cellule hôte (généralement une cellule épithéliale dans la région oro-labiale) grâce à une interaction entre l'héparane sulfate ou les protéoglycanes de la membrane plasmique et les glycoprotéines gB et gC de l'enveloppe virale ainsi qu'une interaction entre la glycoprotéine virale gD et certains récepteurs membranaires (médiateur de l'entrée de l'herpès virus HVEM, nectine-1, nectine-2...), cette étape est appelée l'**Adhésion** (Oren & Amichay, 2021).

L'interaction entre les glycoprotéines virales gH et gL avec les intégrines entraîne

l'endocytose du virus et son entrée dans la cellule hôte par fusion de la membrane plasmique avec la membrane virale et formation de vésicules permettant le transport du virus vers le noyau cellulaire où se déroulera la réplication virale. Les protéines du tégument interagissent avec la dynéine, la dynactine et la kinésine et facilitent ainsi le transport du virus jusqu'au noyau (Oren & Amichay, 2021).

À l'arrivée au noyau, l'ADN viral pénètre au niveau du noyau grâce au pore nucléaire après un processus de décapsidation dans lequel le génome se détache de sa capsid.

Les virions matures encapsidés quittent le noyau et se dirigent vers l'appareil de Golgi où l'enveloppe virale, le tégument et la capsid s'enrichissent en glycoprotéines par un mécanisme d'incorporation mal connu (Oren & Amichay, 2021).

Les virions néoformés sont transportés par des vésicules vers la membrane plasmique où ils sont libérés après lyse de la cellule hôte. Ensuite, ils peuvent soit infecter de nouvelles cellules épithéliales (infection active) soit entrer dans une phase prolongée de latence après avoir atteint les neurones sensitifs du ganglion trigéminal par transport rétrograde à travers les terminaisons nerveuses périphériques (Oren & Amichay, 2021).

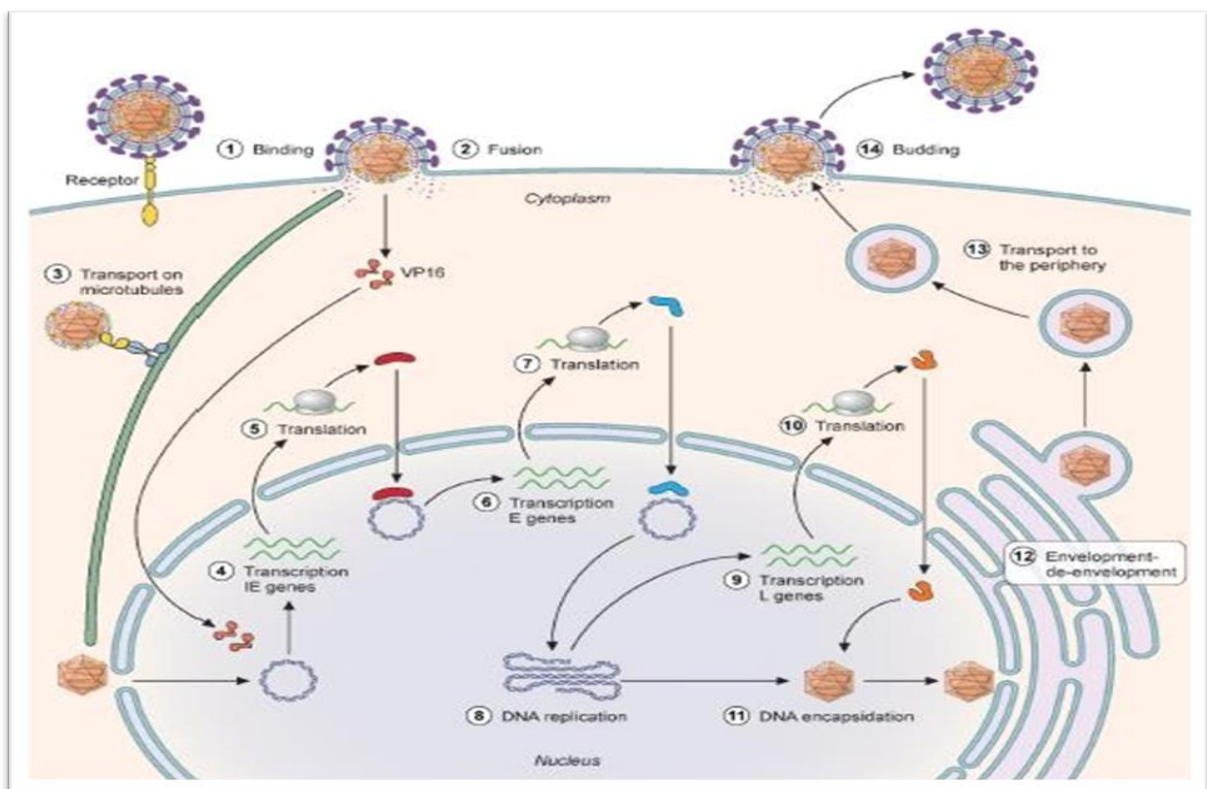


Figure 3: Schéma montrant les étapes du cycle de réplication lytique de l'HSV-1

(Shuyong Zhu, 2021)

2. Phase de Latence:

C'est une phase qui est cliniquement asymptomatique, et qui se déroule au niveau des neurones sensitifs du ganglion trigéminal. La raison de ce tropisme neurologique est mal connue.

Lors de cette phase muette, le virus persiste sous forme d'ADN épisomal avec une expression génétique limitée avec une absence de production de virions. Le virus latent échappe ainsi à la réponse immunitaire et au traitement antiviral qui n'est actif que sur la phase de réplication virale (Shuyong Zhu, 2021).

Selon des études récentes, il n'y a pas d'exclusivité du cycle : il existe une hétérogénéité au sein du ganglion, c'est-à-dire que certains virions peuvent être en latence tandis que d'autres en même temps sont en phase de réplication lytique (Shuyong Zhu, 2021).

La latence peut donner suite à une réactivation virale endogène suite à de multiples facteurs qui va induire une production de virions au sein du corps cellulaire ou péricaryon neuronal qui atteindront l'épithélium de la peau ou des muqueuses oro-labiales par transport antérograde afin de se manifester par des lésions typiques des infections herpétiques (vésicules en bouquet ou en grappes de raisin). Les virions peuvent aussi coloniser le système nerveux central et provoquer une encéphalite ou une méningo-encéphalite qui sont des infections graves et qui doivent être traités en urgence (Shuyong Zhu, 2021).

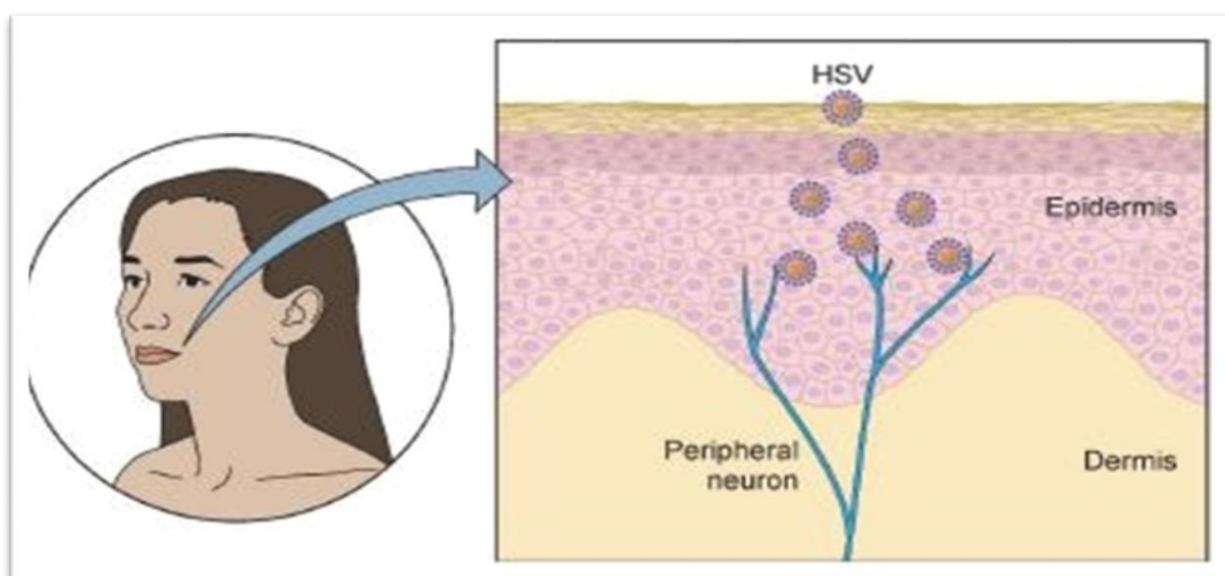


Figure 4: Schéma montrant le passage du virus HSV-1 depuis l'épithélium de la peau vers les terminaisons nerveuses périphériques

(Shuyong Zhu, 2021)

V. Manifestations cliniques de l'infection à HSV-1 :

L'infection à HSV-1 possède un grand polymorphisme clinique, elle est souvent asymptomatique (95%) mais reste transmissible. La symptomatologie varie selon l'âge, l'organe atteint, et l'état immunitaire du patient infecté (*Lauren A. Sadowski, 2021*).

1. Herpès Labial :

C'est l'infection la plus bénigne et la plus fréquente causée par le virus HSV-1, appelée communément « bouton de fièvre ». Elle se manifeste cliniquement par la présence de vésicules douloureuses sur base érythémateuse au niveau de la région oro-labiale. Ces vésicules sont organisées en « bouquet » ou « en grappes de raisin » leur donnant un aspect typique et pathognomonique d'un herpès labial à HSV-1 (*Guedj, Mikbook 4ème édition, 2018*).

Les vésicules peuvent par la suite se rompre et laisser place à des érosions ou ulcérations polycycliques très inflammatoires qui peuvent ensuite évoluer vers des croûtes témoignant d'une rémission spontanée de l'infection (retour du virus à la phase de latence). Or, les rémissions de l'herpès labial sont très fréquentes et peuvent s'avérer parfois gênantes et altèrent ainsi la qualité de vie du patient.

L'apparition des lésions peut être précédée par une phase de prodromes faite de fièvre, myalgie et asthénie généralisée. Les traitements disponibles actuellement sont purement symptomatiques et ne permettent en aucun cas l'éradication virale. Notons que les lésions labiales chez un immunodéprimé sont plus graves, plus inflammatoires et plus étendues et mettent plus de temps à guérir, et ceci même sous traitement antiviral (*Treatment of herpes labialis by photodynamic therapy, 2020*)



Figure 5: Image montrant les lésions typiques de l'herpès labial

(Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL : Systematic Review of Recent Data, 2019)

2. La kératite ou kérato-conjonctivite herpétique :

C'est une inflammation de la cornée qui peut s'accompagner ou non d'une inflammation de la conjonctive. L'infection débute généralement au niveau de l'épithélium cornéen et évolue dans 25% des cas vers le stroma donnant lieu à une kératite stromale qui est la première cause infectieuse de cécité dans le monde, et la deuxième cause de cécité dans les pays développés après la cataracte (*Shuyong Zhu, 2021*).

La cornée normale est une structure oculaire dioptrique avasculaire contenant un très faible taux de leucocytes, ce qui lui confère la propriété de la transparence pouvant offrir une vision claire et nette (*Shuyong Zhu, 2021*).

La kératite est le plus souvent contrôlée par la réponse immunitaire et se résout spontanément dans 1 à 2 semaines. Mais les récurrences de cette infection peuvent parfois mener à des réactions immunes très excessives causant ainsi une inflammation chronique de la cornée.

Par conséquent, cette dernière devient le siège de lésions irréversibles comme la néoangiogénèse caractérisée par l'apparition de néovaisseaux responsables du recrutement et de l'afflux de cellules inflammatoires (leucocytes) au niveau de la cornée avasculaire, et les escarres cornéennes (*Shuyong Zhu, 2021*).

Ces lésions sus-décrites seront à l'origine d'une diminution de l'opacité de la cornée, ainsi que de diverses anomalies structurales dont le résultat est la diminution de la pénétration de lumière vers la rétine due à une perte de la transparence cornéenne.

Cela explique la symptomatologie d'apparition brutale observée chez les patients diagnostiqués de kératite herpétique, à savoir la rougeur et la douleur du globe oculaire témoignant d'une inflammation de la cornée confirmée par la présence d'ulcérations cornéennes après un examen à la lampe à fente, ainsi qu'une baisse d'acuité visuelle, mais aussi l'origine probablement immunitaire de l'inflammation qui fait l'objet de débat chez les experts (*Shuyong Zhu, 2021*).

3. L' Herpès néonatal:

C'est une manifestation très grave de l'infection à HSV-1 observée chez les nouveau-nés avec une prévalence non négligeable. On distingue trois formes cliniques de pronostic différent :

- La forme localisée à la peau (skin = S), les yeux (eyes = E) et la bouche (mouth = M) appelée couramment « SEM ». C'est une forme de bon pronostic avec un taux de mortalité quasi nul.

- L'encéphalite qui apparaît généralement dans les trois premières semaines du post-partum. Son pronostic est plus réservé avec une probabilité plus élevée de développer des séquelles neurologiques à type de déficience intellectuelle malgré le traitement précoce.
- L'infection disséminée avec atteinte de plusieurs organes conduisant à une défaillance multi-viscérale. C'est la forme la plus grave ayant le plus mauvais pronostic avec un taux de mortalité avoisinant les 40% (*Richard & Joel , 2022*).

L'herpès néonatal peut être transmis durant la vie intra-utérine, pendant l'accouchement ou par un contact post-natal avec une mère porteuse du virus. 70% des nouveau-nés atteints d'herpès néonatal naissent d'une mère asymptomatique.

La RT-PCR du liquide céphalo-rachidien (LCR) possède une place primordiale dans le diagnostic virologique puisqu'elle vient se substituer à la biopsie cérébrale et à la culture du LCR.

La positivité de la PCR observée chez 10% des nouveau-nés atteints de SEM est corrélée à un très haut risque de déficience intellectuelle. La PCR peut rester positive jusqu'à 14 jours après l'instauration du traitement antiviral, et ce paramètre conditionne grandement le pronostic.

Il est à noter que l'encéphalite dans le cadre d'un herpès néonatal peut aussi être causée par le virus HSV-2, mais ses manifestations cliniques sont plus sévères, et ses séquelles plus graves.

Un traitement antiviral prophylactique d'une durée de 14 jours peut être instaurée chez un nouveau-né si sa mère est connue séropositive (*Richard & Joel , 2022*).



Figure 6: Image d'un nouveau-né présentant des lésions évoquant un herpès néonatal (SEM)

(Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL : Systematic Review of Recent Data, 2019)

4. La méningoencéphalite herpétique:

Il s'agit d'une inflammation des méninges et de l'encéphale due à la présence de l'HSV-1 au niveau du système nerveux central. C'est la cause la plus fréquente de méningo-encéphalite chez l'enfant et l'adulte, étant donné que l'HSV-2 donne ce type d'affections surtout chez les nouveau-nés et les immunodéprimés. La maladie peut se manifester lors de la primo-infection tout comme lors de la réactivation après la phase de latence (*Shuyong Zhu, 2021*).

Chez les enfants, la morbidité-mortalité est plus élevée avec 70% de séquelles neurosensorielles et psychomotrices. Dans 30% des cas, la tranche d'âge atteinte est entre 3 mois et 6 ans.

L'incidence est la même chez les immunocompétents que chez les immunodéprimés, quoique la mortalité chez ces derniers reste beaucoup plus conséquente. En effet, l'immunité innée adaptative ainsi que les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques du système nerveux central (astrocytes, microglie, oligodendrocytes, neurones...) participent à la protection de l'encéphale contre l'agression virale de l'HSV-1, ce qui pourrait potentiellement expliquer la susceptibilité des immunodéprimés et des malades sous traitement immunosuppresseur à développer une symptomatologie clinique plus sévère (*Shuyong Zhu, 2021*).

La réplication virale au niveau du système nerveux central est à l'origine d'un effet cytopathique entraînant une réponse inflammatoire excessive avec afflux de cellules inflammatoires (leucocytes) grâce aux cytokines chimiotactiques sécrétées par les cellules de la microglie. Il en résulte des troubles de la barrière hémato-encéphalique ainsi qu'un œdème cérébral vasculaire associé à une augmentation de la pression intracrânienne avec risque d'hémorragie cérébrale (*Shuyong Zhu, 2021*).

Les signes cliniques sont présents dans plus de 50% des cas et se résument à un syndrome méningé fébrile comprenant des vomissements, une raideur de la nuque, une phonophobie et une photophobie, sans oublier la présence de symptômes francs d'encéphalite à type de troubles de la conscience (confusion) et de crises convulsives voire comitiales.

Le diagnostic repose essentiellement sur la réalisation d'une ponction lombaire afin de recueillir le liquide céphalo-rachidien (LCR) pour étude cyto-bactériologique, biochimique et sérologique avec la réalisation d'une RT-PCR à la recherche de l'HSV-1 (70% HSV-1 et 30% HSV-2) (*Shuyong Zhu, 2021*).

Le LCR lors d'une méningo-encéphalite à HSV-1 est macroscopiquement clair. L'étude cytologique et biochimique révèle une hyperleucocytose à prédominance lymphocytaire

avec normoglycorachie : « **Toute méningite ou méningo-encéphalite à liquide clair est uneméningo-encéphalite herpétique jusqu'à preuve du contraire** ».

La réalisation d'une imagerie cérébrale (scanner, IRM) est primordiale et incontournable à la recherche de lésions cérébrales associées. Les séquelles sont fréquentes, il s'agit majoritairement de déficits sensitivo-moteurs, altérations des fonctions mnésiques et cognitives, épilepsies et troubles comportementaux (*Guedj, Mikbook 4ème édition, 2019*).

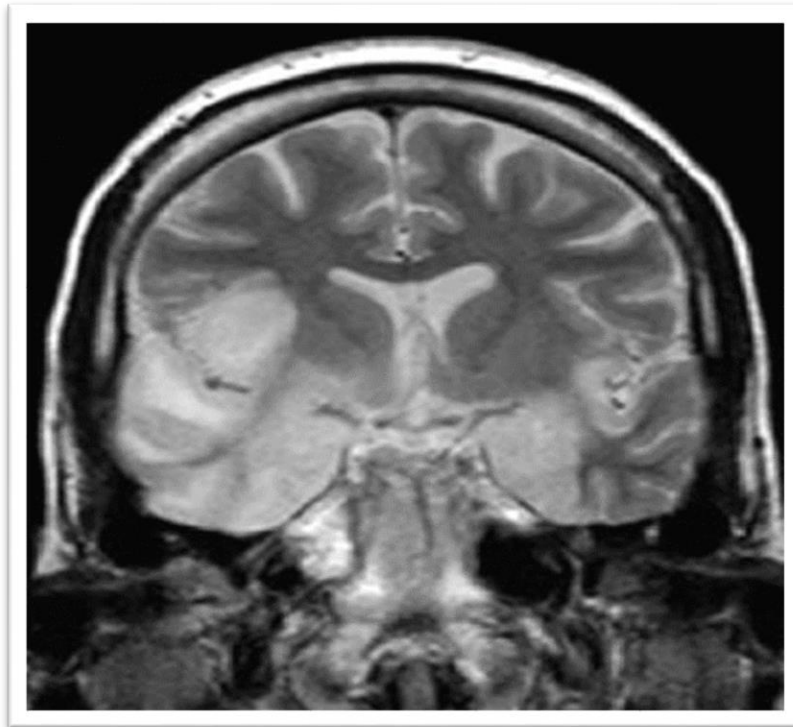


Figure 7: Scanner cérébral d'un patient atteint de méningo-encéphalite à HSV-1

(Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL : Systematic Review of Recent Data, 2019)

5. L'herpès génital :

C'est l'infection sexuellement transmissible la plus fréquente, quoi que le plus souvent causée par l'HSV-2. Mais le taux d'ulcérations génitales dues à l'HSV-1 reste non négligeable.

L'herpès génital peut se manifester lors de la primo-infection, où les symptômes sont plus flagrants et plus marquants, ou lors de la réactivation après latence.

L'âge de prédilection est entre 16 et 40 ans qui correspond à la période où l'activité sexuelle est à son apogée chez les deux sexes (*Shuyong & Abel, 2021*).

Il existe une légère prédominance féminine, Cette infection concerne uniquement 25% des

séropositifs à l'herpès virus. La primo-infection est le plus souvent asymptomatique, et la sévérité des manifestations cliniques de l'état immunitaire et de la charge virale.

L'herpès génital se caractérise par la grande fréquence de ses récurrences, sauf que les récurrences de l'HSV-1 sont moins agressives et moins fréquentes aussi (les récurrences sont de l'ordre de 20 à 60% pour l'HSV-2), sans oublier que 50 à 80% de ses réactivations sont infracliniques (*Shuyong & Abel , 2021*).

Cliniquement, l'herpès génital se présente avec des lésions inflammatoires typiques de l'herpès, similaires à celles observées dans l'herpès labial (vésicules en bouquet sur base érythémateuse), au niveau des organes génitaux externes, et dans la région anale chez les homosexuels. Les vésicules peuvent évoluer en bulles qui peuvent se rompre pour céder la place à des ulcérations génitales très douloureuses et prurigineuses accompagnées de fièvre, myalgies, asthénie et parfois dyspareunie. Chez la femme, on peut observer une inflammation plus ou moins importante du col utérin (*Genital Herpes, 2021*).

L'herpès génital, pour des raisons toujours inconnues, augmente la susceptibilité d'une infection rétrovirale qui potentialise l'inflammation herpétique, la rendant plus sévère avec un risque plus accru de récurrences (*Shuyong & Abel , 2021*).

Chez la femme, l'herpès génital augmente considérablement le risque d'herpès néonatal par transmission materno-fœtale, surtout si la primo-infection se déroule lors du troisième trimestre de grossesse. Toutefois, si la primo-infection a lieu avant le troisième trimestre, les anticorps anti-HSV peuvent traverser la barrière placentaire afin d'assurer la protection du fœtus, et donc le risque devient moins important (*Shuyong & Abel , 2021*).

Le diagnostic reste clinique, car les techniques de diagnostic virologique comme l'immunofluorescence et la PCR sont coûteuses et lentes malgré leur sensibilité et leur spécificité, ce qui les rend inutilisables en pratique quotidienne. Or, le diagnostic reste difficile en raison de l'existence de plusieurs diagnostics différentiels tel que les mycoses génitales, le lichen plan, la dermatite atopique, ou encore les urétrites (*Shuyong Zhu, 2021*).



Figure 8: Image montrant un herpès génital chez la femme

(Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL : Systematic Review of Recent Data, 2019)

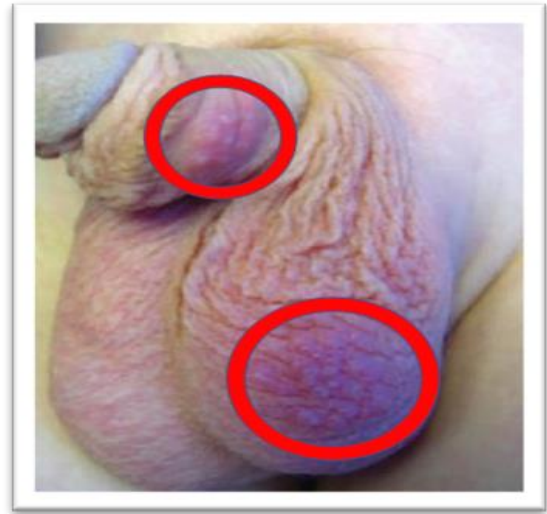


Figure 9: Image montrant des vésicules en bouquet typiques d'un herpès génital chez l'homme

(Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL : Systematic Review of Recent Data, 2019)

VI. Les antiherpétiques :

Les antiviraux actuellement disponibles pour le traitement de fond des infections causées par l'herpès virus n'agissent que sur la phase de réplication virale le forçant ainsi à rentrer dans la phase de latence prolongée au niveau des neurones sensitifs du ganglion trigéminal. ils ne permettent donc pas une éradication virale définitive (*Lauren A , Rista, Zachary , & Barry J , 2021*).

Les antiherpétiques sont classés selon leur cible thérapeutique et leur mécanisme d'action.

1. Les analogues nucléosidiques :

Leur cible est une enzyme virale : l'ADN-polymérase (ADN-p) qui est la clé de la réplication virale. Toute altération de l'ADN-p serait à l'origine de troubles dans la réplication virale, et ainsi l'absence de production de virions infectieux.

Mais l'usage de ces analogues nucléosidiques pourrait potentiellement avoir un effet cytotoxique sur l'hôte en ciblant l'ADN-p de ce dernier qui joue un rôle primordial dans la mitose cellulaire.

Le chef de file de cette classe thérapeutique et le plus largement utilisé dans les infections herpétiques surtout à HSV-1 est l'acyclovir. Sa cytotoxicité est limitée puisqu'il ne cible

jamais l'ADN-p de l'hôte. L'acyclovir exerce son action pharmacologique après une phosphorylation médiée par une enzyme virale : la thymidine kinase (TK). Cette enzyme est présente durant toute la phase de réplication lytique. Sans la TK, il n'y aura pas de phosphorylation de l'acyclovir et il serait donc inactif. Par conséquent, l'HSV-1 peut développer une résistance à l'acyclovir soit par mutation de l'enzyme TK, soit par mutation de l'ADN-p. Parmi les inconvénients de l'utilisation de l'acyclovir, on note sa faible biodisponibilité par voie orale, ce qui le rend plus maniable et plus efficace lorsqu'il est administré par voie intraveineuse.

Le valacyclovir est un autre analogue nucléosidique possédant le même mécanisme d'action que l'acyclovir avec l'avantage d'une forte biodisponibilité par voie orale et une excellente absorption intestinale. Il est ensuite métabolisé par le foie et le rein en acyclovir.

Le gancyclovir est dédié aux infections à cytomégalo virus (CMV) (*Lauren A. Sadowski, 2021*).

2. Les analogues nucléotidiques:

Contrairement aux analogues nucléosidiques, ils ne nécessitent pas une phosphorylation par la TK, donc ils sont actifs malgré la mutation de cette enzyme. Ils sont phosphorylés par des kinases cellulaires de l'hôte.

Le Cidofovir inhibe l'élongation de l'ADN viral, mais possède des effets néphrotoxiques ainsi qu'une faible biodisponibilité orale. L'HSV-1 peut résister à cet antiviral par mutation de l'ADN-p.

L'Adéfovir, qui est normalement un antiviral utilisé contre le virus de l'hépatite B, a prouvé aussi son efficacité pour l'inhibition de la réplication du virus HSV-1, mais n'est pas utilisé en pratique à cause de sa potentielle toxicité rénale (*Lauren A. Sadowski, 2021*).

3. Les inhibiteurs nucléotidiques de l'ADN-polymérase :

Le Foscarnet est un analogue du pyrophosphate qui se lie réversiblement à l'ADN-p virale. Il ne nécessite pas de phosphorylation par l'enzyme TK et il est donc privilégié dans les infections herpétiques résistantes à l'acyclovir. La mutation du site de liaison à l'ADN-p peut permettre au virus de résister à cette molécule. L'usage du Foscarnet reste malgré tout quelque peu limité en vue de sa cytotoxicité comme effet secondaire dû à sa liaison à l'ADN-p cellulaire (*Lauren A. Sadowski, 2021*).

VII. Traitement:

1. Traitement symptomatique:

Le but ultime du traitement des infections à HSV-1 est de soulager les symptômes gênants et améliorer la qualité de vie du patient puisqu'il n'existe pas de moyen pour obtenir une « guérison » définitive. Le traitement symptomatique garde donc une place capitale dans cette optique.

La fièvre ainsi que les douleurs observées dans les diverses formes cliniques (herpès labial, herpès génital, méningo-encéphalite...) peuvent être traitées par le paracétamol qui possède à la fois des propriétés antalgiques et antipyrétiques.

Les myalgies peuvent bénéficier d'un traitement à base d'anti-inflammatoires non stéroïdiens comme l'ibuprofène (*Shuyong Zhu, 2021*).

Dans le cas de l'herpès labial, il est conseillé d'appliquer un antiseptique local. Néanmoins, le traitement antiviral local est inefficace et n'a aucune indication.

Un traitement antiépileptique et anticonvulsivant (valium, benzodiazépines, valproate de sodium...) peut être proposé dans le cadre de signes francs d'encéphalite à type de crises épileptiques ou convulsives.

Dans la kératite ou la kérato-conjonctivite herpétique, l'usage d'un corticostéroïde local peut être recommandé afin d'accélérer la rémission et la guérison, mais il est contre-indiqué en cas de présence d'ulcération cornéenne (*Guedj, Mikbook 4ème édition, 2019*)

2. Traitement antiviral:

Même s'il ne permet pas une éradication virale définitive, le traitement antiviral reste toutefois essentiel puisqu'il agit sur la réplication et force le virus à rentrer en phase de latence, et participe donc à l'amélioration des symptômes cliniques. Il doit donc être employé en parallèle avec le traitement symptomatique (*Lauren A, Rista, Zachary, & Barry J, 2021*).

L'acyclovir est le traitement antiviral le plus largement utilisé en cas de suspicion d'infection à HSV-1. Sa posologie varie s'il s'agit de la primo-infection ou d'une récurrence, et sa voie d'administration dépend du type de manifestations cliniques ainsi que l'état général du patient.

Un traitement d'entretien à base d'acyclovir d'une durée entre 6 et 12 mois en cas de récurrences fréquentes (plus de 6 par an) ou en cas d'immunodépression, afin de prolonger la rémission et éviter au maximum les récurrences (*Guedj, Mikbook 4ème édition, 2019*).

3. Traitement préventif:

Étant donné qu'une infection à HSV-1 ne possède pas de traitement définitif, la prophylaxie reste le seul moyen d'éviter toutes les manifestations de ces infections ainsi que leurs conséquences.

Malgré cela, la prévention contre les infections à HSV-1 est très difficile car il n'existe pas de mesures sûres, et il n'y a pas de consensus universel dans ce sens, sans oublier la forte séroprévalence de ce virus dont la majorité des porteurs est asymptomatique mais peut transmettre le virus par divers moyens, rendant cette prophylaxie très compliquée.

Les mesures prophylactiques pouvant être proposées sont les suivantes :

- Éviter les contacts rapprochés avec une personne présentant une infection active (herpès labiale, kératite, méningite...)
- Éviter les rapports sexuels non protégés, toujours utiliser les moyens de protection comme les préservatifs.
- Ne pas avoir de rapports sexuels avec une personne connue porteuse d'une infection ou d'une ulcération génitale sexuellement transmissible (*Pamela , Joseph V , Andrew C, & Sheila F, 2009*)

Il n'existe actuellement aucun vaccin contre le virus HSV-1, mais plusieurs essais cliniques sont en cours afin de permettre à l'humanité de trouver un moyen d'éradication virale définitive (*Jie Z, Huan , & Bin, 2016*).

Chapitre II : Généralités sur la Culture Cellulaire

I. Culture cellulaire:

La culture cellulaire consiste en le maintien des cellules à l'extérieur d'un organisme vivant dans un environnement contrôlé (*Jennifer Louten, s. d.*). C'est une technique très importante qui permet aux chercheurs de mieux comprendre le fonctionnement des cellules, de tester des produits thérapeutiques et de vérifier la toxicité de certains produits chimiques ainsi qu'elles servent à la production de certains vaccins par l'intermédiaire de la production virale (voir chapitre suivant). En plus, on peut l'utiliser pour produire des tissus de la peau pour traiter les brûlures. Les lignées cellulaires mises en culture peuvent être des cellules capables de se multiplier pendant de longues périodes *in vitro* et qui peuvent donc être maintenues par des subcultures en série (*Aschner et al., 2011*). Elles peuvent être subdivisées en **lignées cellulaires finies**, **lignées cellulaires continues** et **lignées des cellules souches**.

- **Les lignées cellulaires finies** : sont des cultures de cellules qui possèdent la capacité d'être sub-cultivées de nombreuses fois, mais qui finissent par cesser de se répliquer et entrent dans un état de dégénérescence dans lequel la division cellulaire s'est arrêtée mais les cellules restent viables et peuvent également conserver une certaine activité fonctionnelle. De nombreuses lignées de cellules finies ont été établies, on trouve par exemple les lignées de fibroblastes diploïdes humaines qui atteignent la sénescence après 60-70 divisions cellulaires.
- **Lignées cellulaires continues** : Certaines lignées cellulaires présentent une capacité particulière à être sub-cultivées de façon illimitée et elles sont connues sous le nom de lignées cellulaires continues. Elles ne présentent pas la sénescence que subissent les lignées cellulaires finies, et ils sont généralement dérivées de tumeurs ou des tissus embryonnaires normaux

Exemple : HL-60, SH5Y-SY ainsi que les cellules MDCK.

- **Les lignées de cellules souches** : conservent les caractéristiques des cellules souches et peuvent produire une série de types cellulaires différenciées. Elles nécessitent une grande attention dans leur entretien, leur manipulation et leur conservation afin de garantir que

leurs caractéristiques et leur capacité de différenciation soient conservées. Les lignées de cellules souches embryonnaires sont généralement établies et maintenues sur des fibroblastes embryonnaires de souris (*Aschner et al., 2011*).

Les cellules cultivées ont généralement besoin d'un milieu stérile et d'un apport en nutriments pour se développer. En outre, les conditions de culture doivent être stables en termes de pH et de température. Au cours des 30 dernières années, plusieurs types de milieux de base ont été développés et sont maintenant commercialisés. Des exemples de différents milieux de culture et de leurs utilisations sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau I : Exemples des types de milieux de culture

(*Billie Ruth Bird & Francis T.*)

Types de milieux	Exemples
Solutions salines équilibrées	PBS, BSS de Hanks, sels d'Earle DPBS HBSS EBSS
Milieu de base	MEM
	DMEM
	GMEM
Milieu complexe	RPMI 1640
	Iscove DMEM
	Leibovitz L-15
Milieu sans sérum	CHO HEK293

Les constituants de base des milieux de culture :

- Sels inorganiques
- Glucides
- Acides aminés
- Vitamines

- Acides gras et lipides
- Protéines et peptides
- Sérum
- Oligo-éléments
- Milieu essentiel minimal (MEM) :

Le milieu essentiel minimal (MEM) est un milieu de base généralement composé de BSS, d'acides aminés essentiels et de vitamines. En ajoutant d'autres composants - tels que d'autres acides aminés ou des vitamines, des coenzymes, des agents réducteurs, des hormones, des dérivés d'acides nucléiques et du sérum, de nombreux milieux modifiés peuvent être préparés (*Billie Ruth Bird & Francis T.).*

1. Milieu d'entretien (MM) :

Le milieu d'entretien est utilisé pour maintenir les cellules dans un état vivant mais avec un métabolisme relativement faible pendant une période prolongée - plusieurs jours à plusieurs semaines. Dans de nombreux cas, le milieu d'entretien est suffisant pour cet objectif ; cependant, le milieu d'entretien est souvent enrichi par l'ajout d'autres composants. De temps en temps, du sérum est ajouté, mais il est maintenu à une faible concentration - généralement 2% ou moins. D'autres protéines, telles que la bovalbumine ou la gélatine, peuvent également être ajoutées (*Billie Ruth Bird & Francis T.).*

2. Milieu de croissance (GM)

Le milieu de croissance (GM) est le milieu de culture cellulaire le plus enrichi. Il est utilisé principalement pour la croissance des cellules, c'est-à-dire pour les cellules qui subissent de la mitose, et qui augmentent leurs nombres. En général, des produits naturels, notamment du sérum, doivent être inclus dans le milieu pour que les cellules puissent se développer. Dans certaines conditions, certaines cellules peuvent être cultivées dans un milieu sans sérum, mais en général, les cellules se développent mieux dans un milieu qui contient du sérum (*Billie Ruth Bird & Francis T.).*

3. Sérum :

Plusieurs types de sérum (humain, cheval, lapin, etc.) ont été utilisés pour la culture cellulaire ; cependant, le sérum veau est le plus fréquemment utilisé. Le sérum peut contenir des substances inhibiteurs, toxines, anticorps ou agents infectieux - qui peuvent interférer avec la croissance

cellulaire ou l'utilisation ultérieure de la culture cellulaire. Étant donné que le sérum d'animaux plus jeunes favorise une meilleure croissance et qu'il est moins susceptible de contenir des substances interférentes, le sérum de veau fœtal est généralement préféré à celui du nouveau-né ou de l'animal adulte. Les substances infectieuses ou inhibitrices peuvent être éliminées par inactivation du sérum, mais ce procédé peut réduire son potentiel de croissance (*Billie Ruth Bird & Francis T.*).

II. Différentes techniques de culture cellulaire :

1. Décongélation des cellules cryoconservées

La plupart des cellules et surtout celles des mammifères peuvent être conservées dans l'azote liquide (<130°C) et ce pendant de nombreuses années puisque tous les processus biologiques sont arrêtés à ces températures (*Charis-P. & Ludovic*).

Pour récupérer les cellules, 10 ml de milieu complet sont préchauffés dans un bain-marie. Après avoir retiré le tube congelé de l'azote liquide, on le place immédiatement dans un bain- marie à 37°C et on l'agite doucement jusqu'à ce que les deux tiers du contenu soient complètement décongelés. Le tube est essuyé avec de l'éthanol à 70 % et placé dans un poste de sécurité biologique où 1 ml de milieu préchauffé est ajouté goutte à goutte au tube partiellement décongelé afin de minimiser le stress osmotique imposé aux cellules lorsque le DMSO est dissout. Le contenu de l'ampoule est maintenant décongelé complètement et est transféré goutte à goutte dans les 9 ml restants de milieu complet et centrifugé à $300 \times g$ pendant 3 minutes. Après avoir aspiré le surnageant, le culot cellulaire peut être lavé une seule

fois avec du milieu pour éliminer les résidus de cryopréservateurs, Les cellules sont ensuite remises en suspension dans le milieu complet et transférées dans un flacon de culture cellulaire.

La jonction des cellules devrait se produire dans les 24 heures et produire un tapis cellulaire. Il faut noter que la viabilité des cellules après cryoconservation est affectée par leur capacité à faire face aux facteurs de stress de la congélation et de la décongélation. Il est donc recommandé d'effectuer le processus de décongélation aussi rapidement que possible (*Charis-P. & Ludovic*).

2. Dissociation des cellules adhérentes des flacons de culture pour les subcultiver

Les cellules cultivées *in vitro* vont épuiser au fil du temps les nutriments fournis par le milieu, dégagent des métabolites toxiques et deviennent de plus en plus nombreuses. Pour maintenir une culture cellulaire saine, il est donc essentiel de produire une nouvelle culture avec un sous-traitant des cellules de la culture d'origine, en éliminant les impuretés toxiques et en renouvelant les nutriments avec du milieu frais. Le moment approprié pour le passage est lorsque la croissance des cellules adhérentes atteint ~80 % de confluence. Elles peuvent ensuite être dissociées par voie enzymatique ou mécanique pour se détacher de leur substrat. Dans un poste de sécurité biologique, les cellules sont rincées avec une solution salinetamponnée au phosphate (PBS) exempte de Mg^{2+} et de Ca^{2+} pour éliminer les cellules mortes puis elles sont incubées à 37°C avec suffisamment d'enzymes digestives ou d'agent chélateur pour recouvrir la couche monomoléculaire (par exemple, trypsine, collagénase, acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA)). Le temps nécessaire pour détacher les cellules ancrées de leur substrat et des interactions cellule-cellule peut prendre 1 à 60 minutes et dépend du type de cellule et des enzymes digestives utilisées. La dissociation peut être suivie au microscope optique et, une fois terminée, il suffit de taper sur le récipient de culture pour faire déloger les cellules adhérentes restantes. Les cellules détachées sont recueillies dans un tube stérile et le flacon de culture doit également être lavé avec un milieu contenant un agent inhibiteur de la digestion enzymatique et de la dissociation des cellules. Les cellules collectées peuvent être ensuite concentrées et dénombrées puisensemencées dans de nouveaux flacons de culture avec les concentrations désirées (*Charis-P. & Ludovic*).

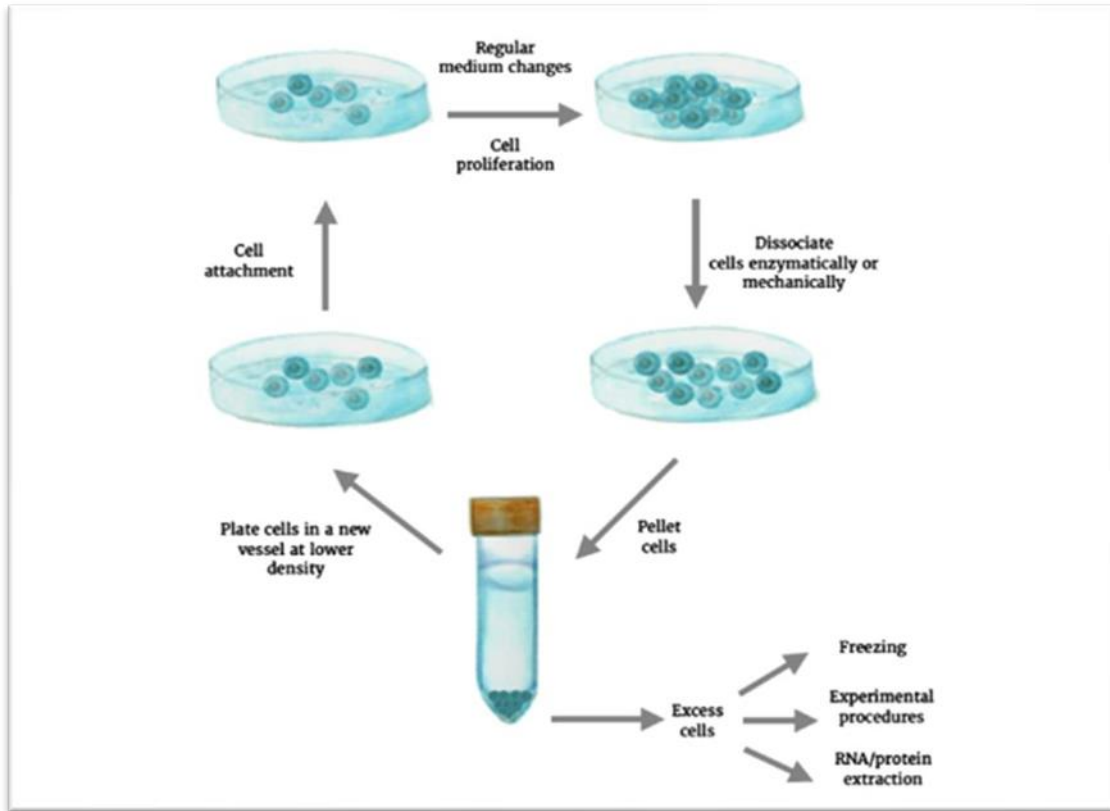


Figure 10: subcultivation des cellules sur des boîtes de cultures cellulaires

(Charis-P. & Ludovic)

3. Quantification des cellules et détermination de la viabilité des cellules

Les cellules peuvent mourir au cours du déroulement de la culture ou pendant la manipulation et le passage. Lorsque l'on compte sur une concentration spécifique des cellules pour démarrer une culture ou que l'on a pour un essai, il est important de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. Le comptage des cellules est également utile pour évaluer le rythme de croissance. Les cellules étant généralement cultivées en millions, le nombre de celles-ci est d'abord compté dans un petit volume, puis extrapolé au volume total. Pour ce faire, toutes les cellules sont dissociées, concentrées et remises en suspension de façon homogène dans un volume de milieu approprié. Dans une dilution 1 :1 avec le bleu de Trypan à 0,4%, un petit volume de la suspension cellulaire est mélangé dans un tube Eppendorf. Le colorant bleu de Trypan ne pénètre que dans les cellules non viables qui sont donc exclues de la numération. Pour ce faire, on dépose 10µl du mélange de cellules dans du bleu de Trypan sur un hématimètre (*Figure15*). En utilisant un microscope inversé, un contraste de phase et un grossissement d'au moins 10X, toutes les cellules situées dans les quatre carrés extérieurs sont comptées. Les cellules viables présentent un "halo" plus

foncé, tandis que les cellules non viables sont colorées en bleu/noir. Pour déterminer le nombre total des cellules viables, le nombre de cellules trouvées dans les quatre carrés est divisé par 4 (pour déterminer le nombre moyen de cellules dans 1 mm²), multiplié par 10⁴ (pour obtenir le nombre de cellules par ml), multiplié par 2 (pour tenir compte du facteur de dilution du bleu Trypan) et multiplié par le volume initial de milieu de la suspension cellulaire entière. Le pourcentage de cellules viables peut être déterminé en divisant le nombre de cellules non colorées par le nombre total des cellules, et en multipliant le rapport par 100. Une culture cellulaire saine est caractérisée par une viabilité cellulaire de 80 à 95 % (Charis-P. & Ludovic).

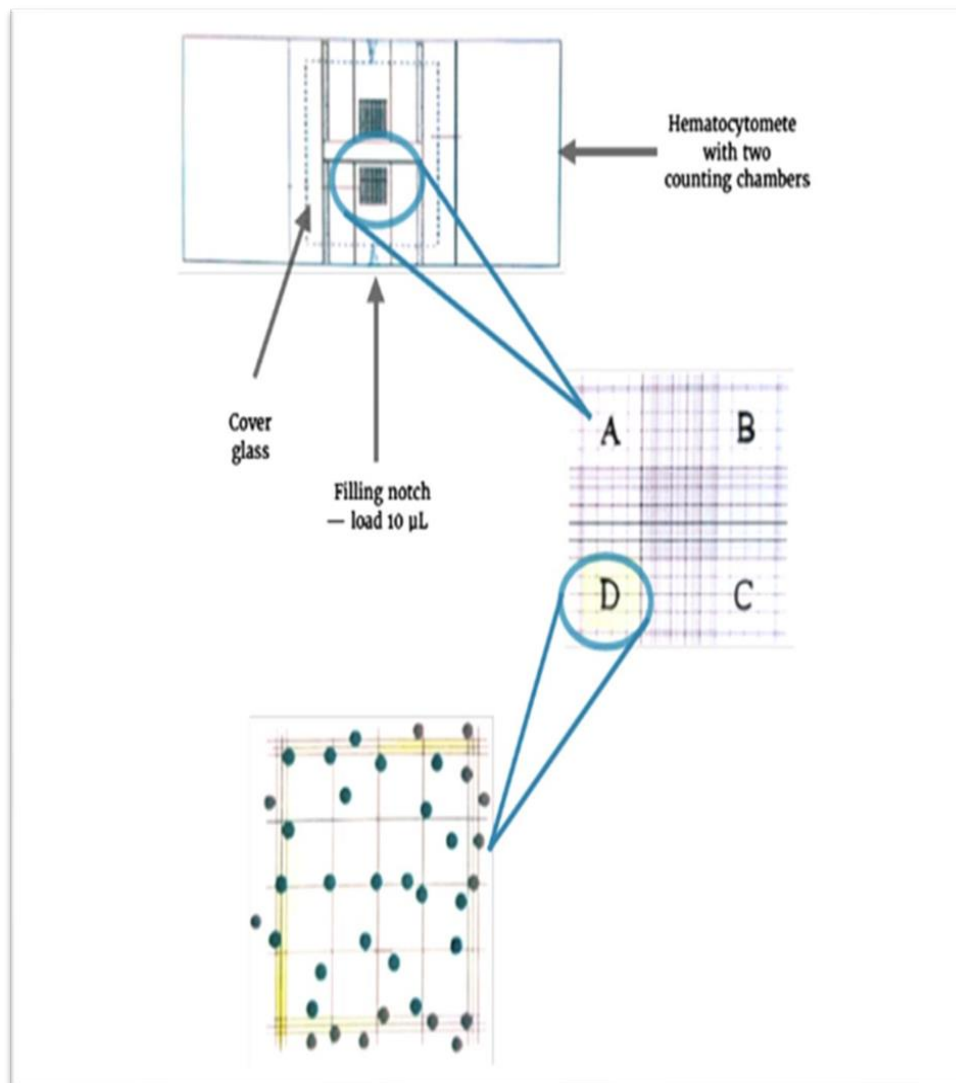


Figure 11: Numération des cellules en utilisant le Bleu de Trypan

4. Subculture des cellules en suspension

La subculture des cellules en suspension peut être réalisée en prélevant aseptiquement un tiers de la solution en suspension cellulaire et en remplaçant le volume par du milieu complet préchauffé (*Charis-P. & Ludovic*).

5. La centrifugation des cellules

Afin de concentrer les cellules pour les transférer dans de nouveaux flacons de culture cellulaire, les congeler ou les utiliser dans d'autres expériences, la suspension cellulaire est centrifugée à $300 \times g$ pendant 10 minutes. Après avoir éliminé le surnageant, le culot cellulaire est remis en suspension dans le milieu souhaité en pipettant doucement les cellules de haut en bas trois fois.

Remarque : Les cellules individuelles peuvent être assez fragiles et il est donc conseillé de ne pas centrifuger à des vitesses élevées ou de pipeter vigoureusement (*Charis-P. & Ludovic*).

Chapitre III : Notions de base sur la Culture Virale

I. Principe:

La culture virale est définie comme étant l'inoculation d'une ou plusieurs lignées cellulaires par un échantillon ou prélèvement infecté par un virus dans le but de mettre en évidence la présence de ce dernier dans le cadre d'un diagnostic virologique direct (*Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology, 2007*).

Cette méthode a vu le jour dans le début des années 1900 avec l'avenue des techniques d'isolement et de multiplication des cellules *in vitro*, permettant ainsi aux virologues de concevoir la brillante idée d'utiliser cette propriété afin de détecter différents virus et étudier leurs caractéristiques (*Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology, 2007*).

La culture cellulaire permet l'identification des virus par l'étude de leur effet cytopathique (ECP) qui est en réalité le résultat du parasitisme viral et la multiplication du germe au dépend de la cellule hôte. Les manifestations cytologiques et microscopiques de l'ECP peuvent aller d'une simple altération de la forme cellulaire avec perte de la sphéricité, jusqu'à la formation de syncytiums voire lyse cellulaire. Chaque virus possède un ECP spécifique permettant son identification par observation microscopique de la culture cellulaire inoculée (*Alexander A. , Irina V., & Dmi, 2020*).

II. Généralités sur les techniques et les étapes de la culture virale :

Les cellules utilisées pour la culture et l'inoculation virale peuvent être d'origine humaine ou animale, diploïdes ou hétéropléïdes. Le laboratoire peut soit se procurer des cellules prêtes pour la culture ou les préparer lui-même par ses propres techniciens. Les cellules sont généralement issues d'un tissu histologique, et sont par conséquent désagrégées par des méthodes chimico-enzymatiques avant d'être utilisées. Actuellement, les cellules sont le plus souvent préparées au sein du laboratoire et sont conservées optimalement par cryogénéisation, ce qui permet d'éviter les contraintes de transport vers le laboratoire et préserver la qualité des cellules utilisées (*Elad , Efi , Boaz , Tomer , & Orly , 2020*).

Quant au prélèvement infecté par le virus concerné, il doit être transporté dans les plus brefs délais vers le laboratoire afin de conserver au maximum son titre infectieux. La qualité du prélèvement conditionne aussi la réussite de cette méthode puisqu'elle permet d'obtenir un échantillon ayant une haute charge virale (*Elad , Efi , Boaz , Tomer , & Orly , 2020*).

Le transport du prélèvement est directement conditionné par le site prélevé : si le prélèvement provient d'un site non stérile contaminé par de la flore microbienne comme la muqueuse génitale, la peau, ou le nasopharynx, il est conservé dans un tube enrichi par des antibiotiques ainsi qu'une substance protéique comme l'albumine ou la gélatine. Par contre, si l'échantillon vient d'un site naturellement stérile comme le LCR ou le sang, il est transporté par l'intermédiaire de tubes stériles (*Elad , Efi , Boaz , Tomer , & Orly , 2020*).

Ensuite, les cellules préalablement préparées sont inoculées par l'échantillon infecté et sont conservées pendant une durée précise, et dans des conditions d'humidité, de pH et de température strictes et prédéterminées qui dépendent de la nature du virus suspecté et des cellules inoculées (*Elad , Efi , Boaz , Tomer , & Orly , 2020*).

Après une certaine durée, on observe sur une lame sous le microscope l'apparition de changements structuraux cellulaires dégénératifs témoins de la prolifération virale, ou effet cytopathique (ECP). La centrifugation peut permettre une apparition plus rapide de l'ECP car la vitesse du mouvement rotatoire provoquée accélère la réplication et la prolifération virale (*Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology, 2007*).

L'effet cytopathique fait surface suite à une interaction antigène-anticorps, c'est pour cela que les lames sont fixées par immunofluorescence à base d'antigènes monoclonaux. La présence de fluorescence témoigne ainsi de la présence d'anticorps, et donc d'un ECP viral.

Le type et la localisation de la fluorescence dépend du virus concerné, cela s'explique par la spécificité de l'effet cytopathique pour chaque virus. Concernant l'HSV-1, l'apparition de l'ECP est très rapide (dans les premières 24 heures suivant l'inoculation), rendant la culture une méthode idéale pour son diagnostic (*Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology, 2007*).

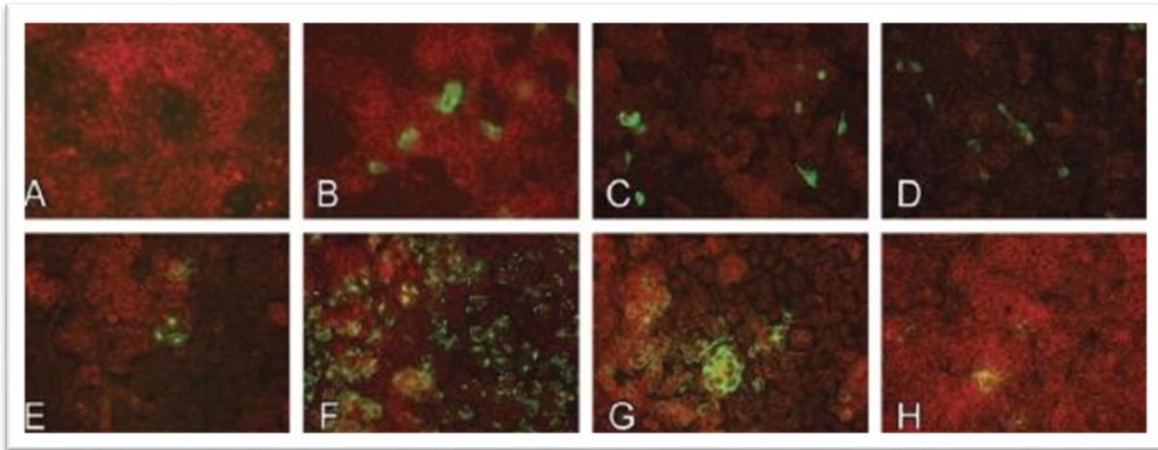


Figure 12: Détection de virus respiratoires par immunofluorescence

(Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology, 2007)



Figure 13: Détection par une immunofluorescence des virus de la famille Herpesviridae

(Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology, 2007)

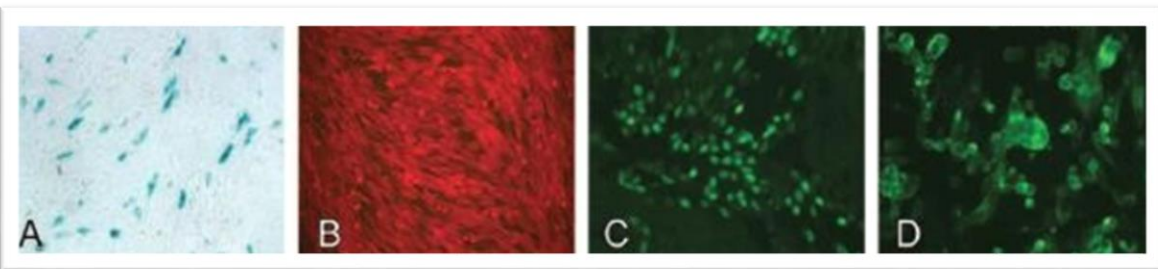


Figure 14: Détection des virus HSV-1 et HSV-2 par immunofluorescence

(Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology, 2007)

III. Avantages de la culture virale :

Ce n'est pas pour rien que la culture virale a obtenu le titre de « Gold Standard » dans le diagnostic virologique direct compte tenu de ses multiples avantages.

Le coût de la culture virale est relativement faible puisqu'elle a grandement diminué l'usage d'animaux expérimentaux en cédant la place à l'emploi de cellules isolées, sans oublier que son matériel est peu coûteux et facile à manipuler (Alexander A. , Irina V., & Dmi, 2020).

Elle permet l'isolement d'un grand nombre de virus (HSV, adénovirus, CMV, poliovirus, entérovirus, Ebola, SARS-CoV, VZV...) avec une très grande sensibilité.

Elle contribue à une étude approfondie des propriétés du virus (affinité pour l'hôte, pouvoir prolifératif, diamètre, structure...) ainsi que leur viabilité afin d'orienter le choix thérapeutique (infection active ou latente) (Alexander A. , Irina V., & Dmi, 2020).

IV. Limites de la culture virale :

Malgré le fait que la culture virale soit la méthode de référence dans le diagnostic virologique, cela n'empêche qu'elle présente des limites rendant son utilisation de plus en plus décroissante au fil des années au dépend d'autres techniques plus adéquates (Alexander A. , Irina V., & Dmi, 2020).

La culture virale est en grande partie conditionnée par la qualité du prélèvement initial, et donc toute altération de ce dernier compromettrait le reste de la procédure.

C'est une technique opérateur-dépendante qui nécessite une grande expérience de l'observateur afin d'identifier le virus grâce à son effet cytopathique (Alexander A. , Irina V., & Dmi, 2020).

La culture virale ne permet pas dans la majorité des cas l'obtention de résultats rapides en comparaison avec les techniques moléculaires actuelles en raison de la période d'incubation généralement longue des virus (au minimum 24 heures pouvant aller jusqu'à 2 semaines).

L'effet cytopathique ne permet pas d'identifier un virus de manière précise, il permet uniquement d'identifier la famille virale.

Certains virus sont incapables de proliférer dans des milieux de cultures ou *in vitro*, tandis que d'autres ne produisent pas d'ECP visible, rendant la culture virale une méthode inappropriée pour leur détection (Alexander A. , Irina V., & Dmi, 2020).

Toutes ces contraintes sont à l'origine de la dégression observée dans l'utilisation de la culture cellulaire dans le diagnostic virologique. Les techniques moléculaires et d'amplification

génomique comme la RT-PCR ont pris le relais et sont privilégiées en raison de leur disponibilité, leur rapidité ainsi que la grande fiabilité des résultats obtenus sans besoin d'experts pour pouvoir les interpréter. Avec cette transition actuelle, le devenir futur de la culture virale reste sombre et problématique (*Alexander A. , Irina V., & Dmi, 2020*).

Matériel et Méthodes

I. Culture des cellules Vero

Les Cellules VERO sont une lignée cellulaire épithéliales qui a été isolée et établie à partir de rein de singe vert adulte d'Afrique (*Verda Reno*) en mars 1962 par Y. Yasumura et Y. Kawakita au Japon. Le nom donné à cette lignée cellulaire a été choisi par le Dr. Yasumura et provient de la langue Esperanto. « Vero » signifie la vérité en Esperanto, mais est aussi l'acronyme de « Verda » et de « Reno » (vert et rein respectivement en Esperanto). Elle a été transmise en 1964 à la banque cellulaire mondiale ATCC au passage 113. Elle a ensuite été propagée jusqu'au passage 121 avant d'établir une banque cellulaire. Cette lignée cellulaire était alors cultivée en milieu M199 avec 5 % de sérum (*Petiot, 2018*).

La lignée cellulaire Vero a été développée principalement pour des productions industrielles à grande échelle. En 1984, elle a été utilisée pour la première fois par Montagnon et al. pour la production de vaccins viraux contre les poliovirus.

Alors, les cellules à cultiver sont déjà conservées dans l'azote liquide (salle de cryoconservation) et ils vont être soumis en premier à une décongélation avant d'être cultivées.

1. Décongélation:

La décongélation des cellules se fait en faisant sortir le tube contenant les cellules de la salle de cryoconservation, et le laisser à température ambiante pour se décongeler. On prépare en même temps un flasque de 25cm²(*Figure15*) de culture avec 10ml du milieu d'entretien des cellules (MEC) préchauffé à 37°C, dont on a ajouté 10% de sérum de veau fœtal (SVF) pour l'enrichir, puis on transfère doucement le 1ml de suspension cellulaire décongelée dans le milieu de culture afin de procéder à la cultivation.



Figure 15: Image montrant des flasques de culture cellulaire de différentes surfaces

2. Culture des cellules :

Après avoir mis les cellules dans le milieu de culture, on observe leur confluence sous microscope, puis on met le flasque dans un étuve à 37°C/5% CO₂ afin d'incuber les cellules pendant 6h, après lesquelles on change le milieu du flasque. Il est nécessaire d'indiquer que chaque type de cellules se cultive dans des conditions différentes et avec des milieux de culture différents, dans notre cas, on a utilisé le Milieu d'Eagle Modifié de Dulbecco (DMEM) qui est une nouvelle version de Milieu Minimum de Eagle original (MEM).

3. Trypsination des cellules :



Figure 16:Image montrant le processus de trypsination

Après des jours d'incubation des cellules (4-5 jours), on observe les cellules sous un microscope inversé (*Figure 17*), pour voir la confluence et le tapis cellulaire formé de cellules adhérentes sur la surface du flasque. On procède alors à la trypsination qui consiste en l'ajout de 1ml de trypsine-EDTA (*Figure 18*) au flasque après avoir éliminé le milieu qu'il contient, puis le mettre à 37°C pour assurer l'activation de trypsine pendant 3 à 5min, afin de faire détacher les cellules de la surface et de les dissocier les unes des autres. Puis, on ajoute le MEC pour neutraliser l'effet de la trypsine.



Figure 17: Image montrant un microscope inversé



Figure 18: Image montrant la solution de Trypsin/EDTA

4. Numération des Cellules :

Pour la numération des cellules, on effectue une dilution des cellules. Pour ce faire, on prend un tube Eppendorf où on met 900 μ l du bleu de Trypan et 100 μ l des cellules, puis à l'aide d'une micropipette, on prend la solution diluée, on la met sur la cellule de comptage (hématimètre) (*Figure 19*), puis on compte le nombre des cellules existantes sous microscope (*Figure 20*). Le nombre des cellules est calculé à l'aide d'une formule appropriée à l'hématimètre utilisée.



Figure 19: Image représentant une hématimètre

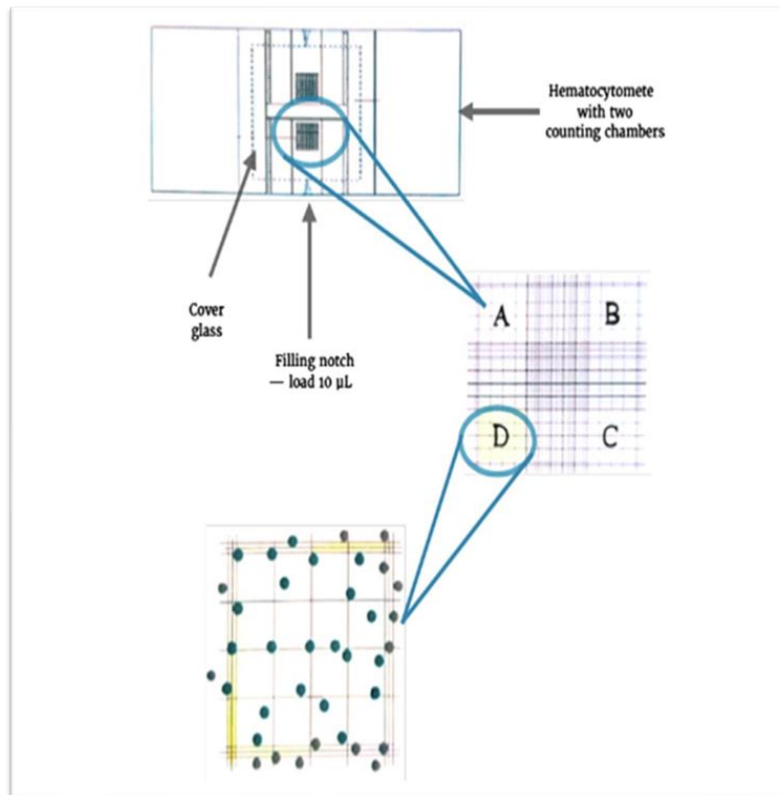


Figure 20: Schéma représentant les cellules à compter sous microscope

5. Mise en congélation des cellules :

Il arrive parfois qu'on a suffisamment multiplié les cellules et qu'on veut les conserver pour des futures expériences. Pour ce, on procède à la congélation des cellules mais à l'aide d'un milieu spécifique (milieu de congélation) pour éviter toute explosion des cellules. Ce milieu contient le Milieu d'Entretien des Cellules (MEC), le Sérum de Veau fœtal et le Dimethyl sulfoxid (DMSO) avec respectivement 700µL, 200µl et 100µl pour la préparation d'un cryotube de congélation de 1ml.

Après avoir préparé le milieu de congélation, on récupère les cellules contenues dans le flasque de culture à l'aide de la trypsine, on centrifuge pour séparer les cellules du reste de milieu de culture, puis on transfère les cellules vers le cryotube de congélation et on les met à +4°C en premier lieu, puis à -80°C toute une nuit avant de les transférer dans l'azote liquide dans la salle de cryoconservation.

II. Culture virale

La culture virale se fait dans la salle de laboratoire désignée à la culture des virus. On produit les virus tout en respectant les mesures de sécurité biologique pour éviter toute infection ou contamination de matériel du laboratoire.

Afin de déterminer le titre infectieux du Virus Herpès Simplex-1 (HSV-1), Il faut tout d'abord isoler le virus et observer son effet cytopathique (ECP).

1. Isolement du virus de l'Herpès Simplex-1 sur culture cellulaire

L'Isolement viral sur culture cellulaire est une méthode de référence pour mettre en évidence un virus. Elle repose sur l'inoculation des cellules mises en culture par un échantillon biologique potentiellement infecté par le virus.

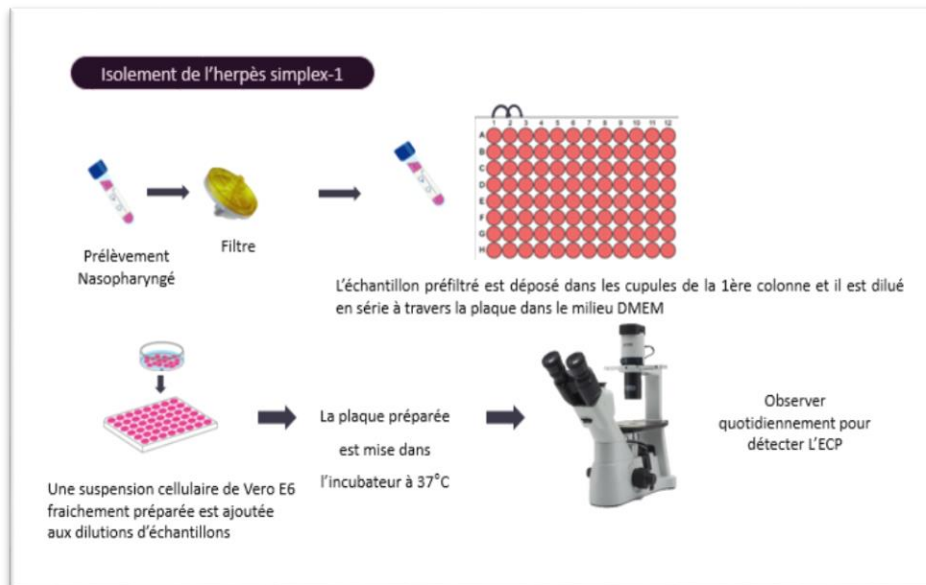


Figure 21: Schéma représentant le cheminement de l'isolement du l'HSV-1

Dans notre cas, l'isolement a été réalisé en filtrant l'échantillon contenant le virus en un aliquot. Dans une plaque de culture de 96 puits, on a déposé 50µl de DMEM dans les 3 premiers puits de chaque colonne à partir de la deuxième colonne à la sixième, la première colonne étant réservée au virus pur. On ajoute alors 100µl de ce dernier dans chacun des 3 puits de la 1ère colonne. Après, on procède à une dilution en cascade en prélevant 50µl des puits de la première colonne et en les ajoutant à la deuxième colonne. On change les cônes avant de mélanger le contenu

des cupules de la deuxième rangée avant d'en prélever à nouveau 50µl et les déposer dans la colonne suivante, et ainsi de suite jusqu'à la dernière colonne. A la fin, on ajoute 100µl des cellules Vero E6 dans tous les puits avant d'incuber la plaque à 37°C. On démarre la lecture microscopique après 24 heures d'incubation, qu'on continue à faire jusqu'à observation d'un effet cytopathique individualisé.

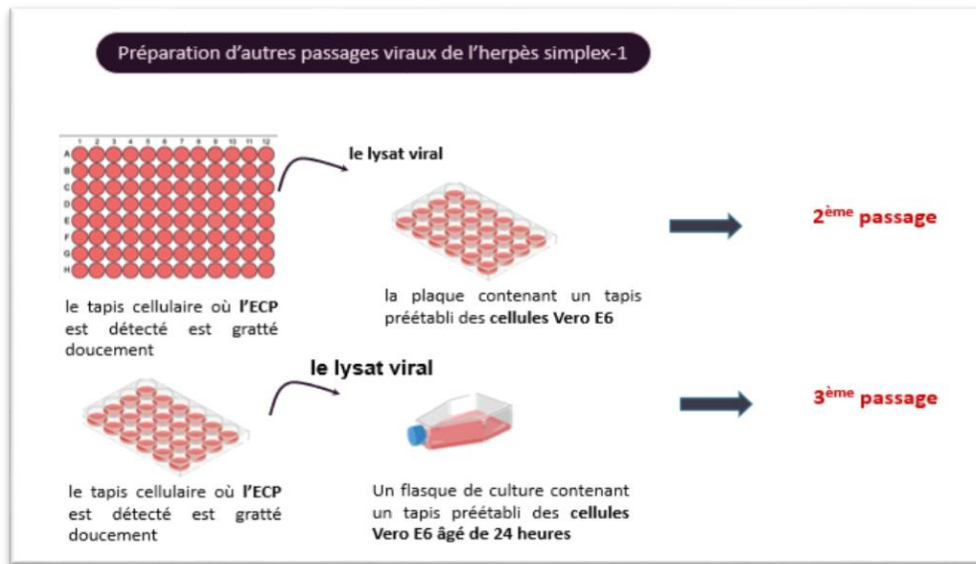


Figure 22: Schéma représentant la préparation d'autres passages viraux de l'HSV-1

Pour produire une autre quantité de virus, on a effectué d'autres passages viraux. On a donc pris la plaque où l'ECP est détecté et on la gratte doucement puis on transfère le lysat viral vers des cellules préétabli afin de les infecter → c'est le 2^{ème} passage.

Puis pour une 2^{ème} fois après détection d'ECP on effectue un 3^{ème} passage on gratte à l'aide d'une pipette les cupules contenant le virus pour infecter d'autre cellules dans le flasque, et ainsi de suite jusqu'à avoir une quantité suffisante de virus pour la quantification du virus.

2. Titrage infectieux (quantification du virus) :

Le Titrage infectieux consiste en la détermination du nombre de doses infectieuses d'une production virale donnée.

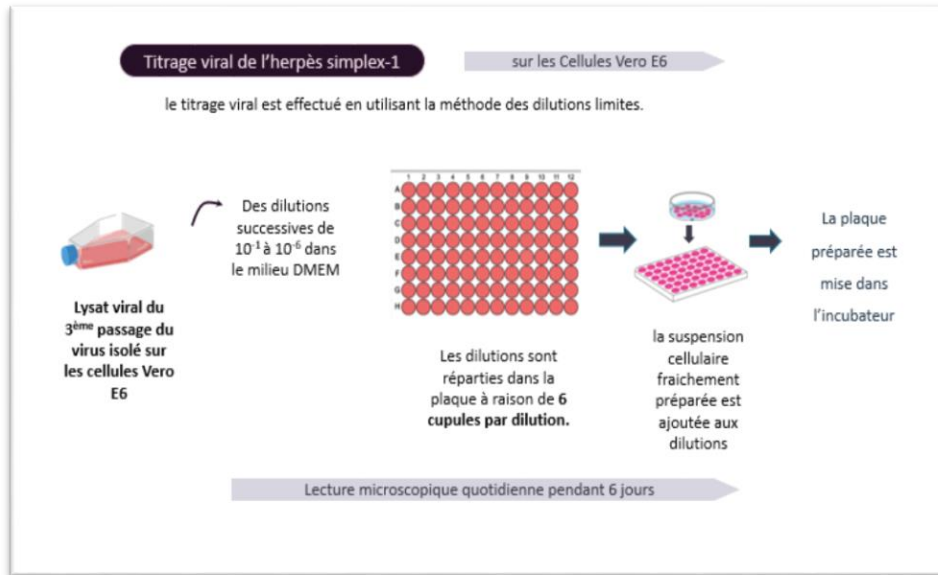


Figure 23: Schéma représentant le déroulement du titrage viral de l'HSV-1

Afin d'effectuer le titrage infectieux du virus Herpès Simplex-1, une série de dilution de ce dernier en 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} est réalisée, puis, dans une plaque de culture de 96 puits, 50 μ l de chaque dilution sont déposés dans chaque cupule, avec 6 cupules par dilution, respectivement de la 1^{ère} colonne à la 6^{ème} colonne. Après on ajoute 100 μ l de cellules Vero dans chaque puits avant d'incuber la plaque à 37°C, et de lire les résultats tous les jours pendant 6 jours.

La lecture microscopique consiste en la détection de l'effet cytopathique de l'herpès simplex-1. Vers le 6^{ème} jour, on détermine la vraie valeur du titre infectieux du virus en doses infectieuses ou **DICT50/ml**.

III. Evaluation et gestion des risques

L'évaluation des risques se fait par le recours à des méthodes d'analyse de risques, ces méthodes contribuent à la mise en œuvre des mesures d'atténuation des risques. Le choix de la méthode dépend du contexte et des particularités de l'organisme, ainsi la nature du risque qu'on doit évaluer.

En effet pour l'évaluation des risques professionnels liés aux pratiques de culture cellulaire et virales, dont le personnel du laboratoire peut s'exposer, dans ce sens on trouve la méthode

d'Analyse des modes de défaillances, de leurs effets et de leurs criticités (AMDEC) qui est une méthode de référence. Cette méthode est fondée sur sa simplicité et elle nécessite une présence sur le terrain et une observation de tous les détails de manipulation au cours des tâches exécutées par le personnel au laboratoire.

➤ **AMDEC:**

L'évaluation des risques comprend trois paramètres [14]:

- Le niveau d'exposition **NE (Fréquence d'exposition)** : tient compte de la durée durant laquelle le personnel du laboratoire est potentiellement exposé au risque.
- Le niveau de gravité **NG (Gravité)** : traduit la gravité des conséquences d'un accident, sans tenir compte de mesures de prévention existantes.
- Le niveau de risque **NR (Criticité)** : est le produit du niveau de gravité et du niveau d'exposition.

$$NR = NE \times NG$$

ou encore

$$\text{Criticité} = \text{Gravité} \times \text{Fréquence d'exposition}$$

a. Gravité

La gravité des dangers est une variable qui présente l'intensité des effets d'un phénomène dangereux et le degré des conséquences pouvant en découler lors de l'exposition. En effet, les situations dangereuses sont évaluées selon les 4 niveaux (Tableau II)

Tableau II: Cotation des niveaux de gravité.

Gravité	Dénomination	Cotation
Faible	Accident ou maladie sans arrêt de travail	1
Moyenne	Accident ou maladie avec arrêt de travail	2
Grave	Accident ou maladie avec incapacité permanente partielle	3
Très grave	Accident ou maladie mortels	4

b. La probabilité d'occurrence ou fréquence d'exposition

La probabilité d'occurrence renseigne sur la fréquence et la probabilité d'apparition du dommage (Tableau III) [14].

Tableau III: Cotation de la probabilité de L'occurrence

Fréquence	Cotation	Notation
Faible	Très improbable (une fois par an)	1
Moyenne	Improbable (une fois par mois)	2
Fréquente	Probable (une fois par semaine)	3
Très fréquente	Très probable (quotidienne ou permanente)	4

c. La criticité

C'est un paramètre issu de la combinaison de la gravité des dangers et la probabilité d'occurrence (fréquence), il reflète le niveau de risque brut qui va juger sur la priorité des mesures de maîtrise qu'il faut mettre en place (Tableau IV)

Tableau IV: Niveau de Criticité

Criticité	Priorité
De 1 à 4	3
De 5 à 8	2
De 9 à 16	1

- **Vert** : Priorité 3 → Situation peut critique mais à surveiller.
- **Jaune** : Priorité 2 → Situation à améliorer.
- **Rouge** : Priorité 1 → Situation à améliorer de toute urgence [14]

Résultats et Discussion :

I. Culture des cellules Vero E6

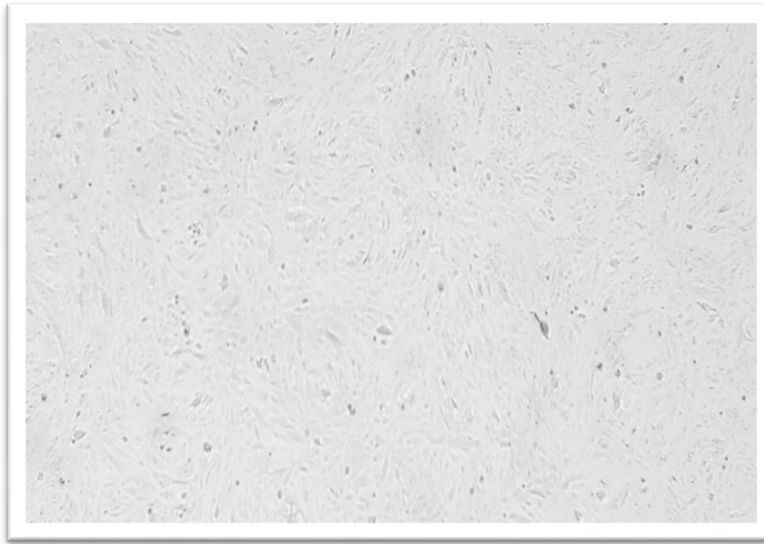


Figure 24: Image représentant les Cellules Vero E6 observées sous microscope avec un grossissement X10

Après 5 jours d'incubation , les cellules sont observées sous un microscope inversé, on voit alors les cellules qui sont adhérentes sur la surface du flasque en formant un tapis cellulaire avec une confluence de 80%.

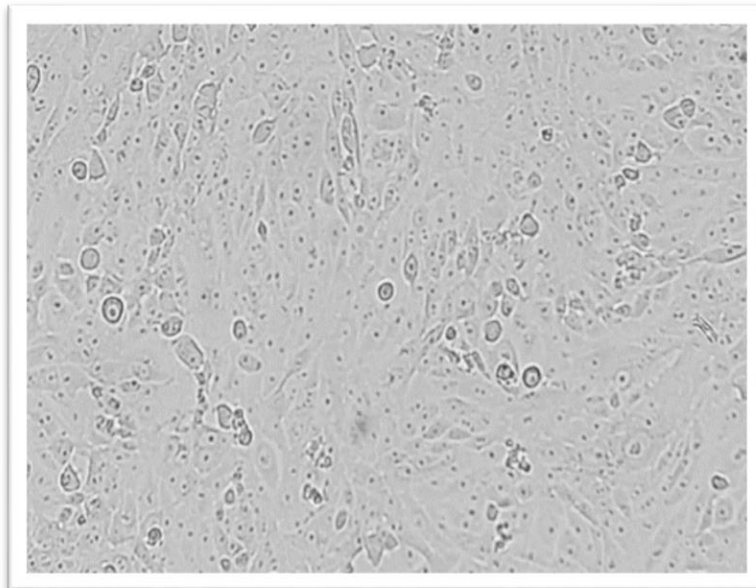


Figure 25: Image représentant les Cellules Vero E6 observées sous microscope avec un grossissement plus grand

II. Isolement du Virus Herpès Simplex-1 sur culture cellulaire :

- Détection d'ECP 48 heures après l'inoculation :

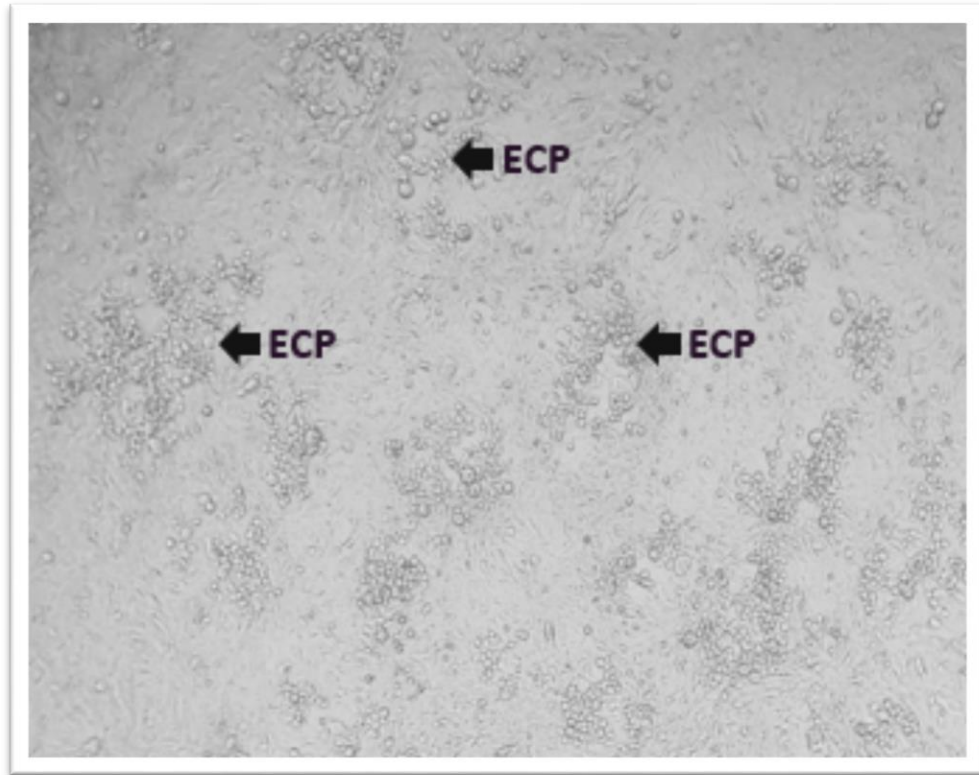


Figure 26: Image représentant l'ECP de l'HSV-1 sur cellules Vero E6 infectée, observé sous microscope avec un grossissement X10

Après 48h de l'inoculation du virus sur culture cellulaire, on observe au microscope l'ECP caractéristique de l'HSV-1 : des cellules rondes et réfringentes en foyers en « grappes de raisin ».

Normalement Les cellules Vero E6 présentent une forme polygonale en tapis cellulaire, mais après l'infection viral par l'herpès simplex-1, les cellules infectées se sont agrandies considérablement, ont pris une forme ronde et se sont agglutinées en grappes de raisin ainsi qu'elles se détachent du tapis cellulaire (*Figure 27*).

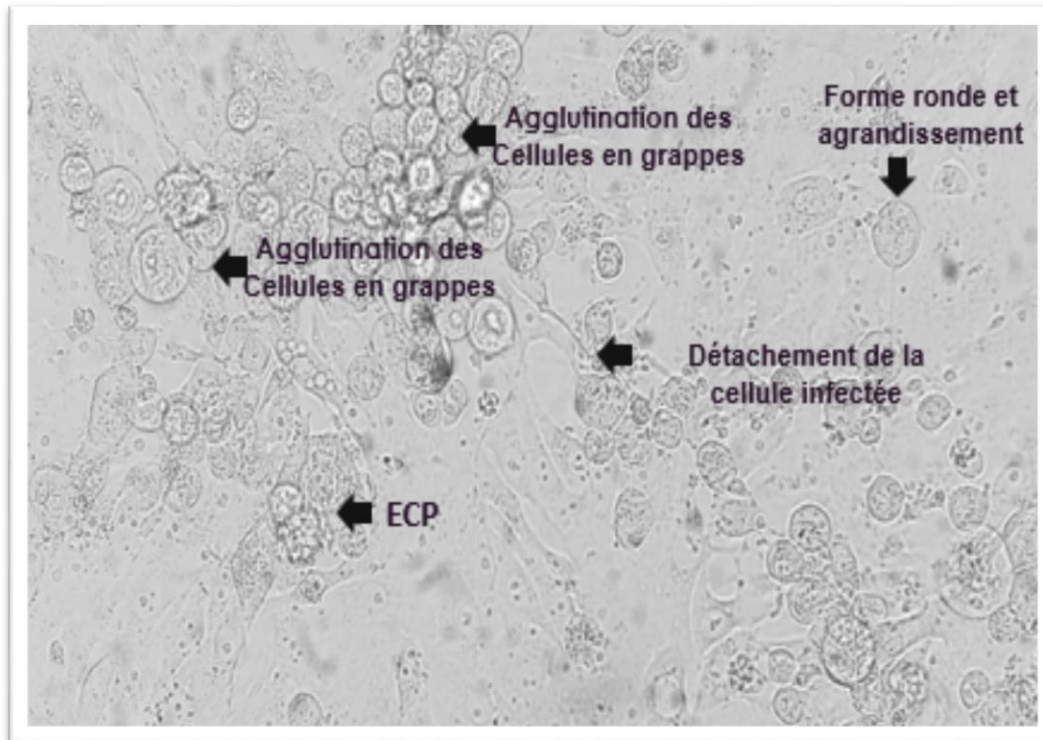


Figure 27: Image représentant l'ECP de l'HSV-1 sur cellules Vero E6 infectées, observé sous microscope avec un grossissement plus grand

III. Titrage Viral :

Après avoir détecté l'effet cytopathique de l'herpès simplex-1, on effectue une lecture microscopique pour déterminer le titre infectieux. On a trouvé donc vers le 6^{ème} jour un titre viral de 3,87 **log DICT₅₀/ml** pour le 3^{ème} passage.

Concernant le titre viral après 24 heures, à une température de 4°C le titre est de 4,34 Log DICT₅₀/ ml et à une température de -80°C, il est de 4,1 Log DICT₅₀/ml. En outre, Le virus reste viable après 10 jours à température ambiante, mais le titre a diminué considérablement arrivant à 2,94 **Log DICT₅₀/ml**.

IV. Gestion des risques:

- La Méthode AMDEC :

Grille d'évaluation des risques biologiques au niveau de l'unité de Culture Cellulaire						
Phase pré-analytique						
Fonction	Dangerosité	Risque	Evaluation des risques			Pratiques préventives.
			F	G	C	
Réception des échantillons	Réception et triage	-Tubes restés ouverts -Contact direct avec le matériel biologique -Déversement	2	2	4	-Le port des EPIs -Faire attention lors du déplacement des tubes. -Utilisation d'un portoir adapté pour le dépôt des tubes -Informer le personnel de la nature de l'échantillon.

Déplacement des échantillons vers le laboratoire	-La chute des échantillons, et par conséquent le bris des récipients d'échantillons ou leur perte.	-Contamination du trajet de transport des échantillons -Formation des aérosols -Perte ou vol des échantillons	2	1	2	-Utilisation des boîtes fermées -Prise des précautions lors du transport. -Fournir un chariot de transport
Agitation des prélèvements	-Vortexer des tubes qui ne sont pas bien fermés	-Formation des aérosols -Inhalation d'aérosols -Déversement	2	3	6	-Le port des EPI (gants à usage unique ; surblouse à usage unique et masqueFFP2) -S'assurer que les tubes sont fermés

						avant de les vortexer -Décontamination en surface des tubes de prélèvements -Ouverture sous PSM de type II. -Nettoyage régulier du vortex
Phase analytique						

<p>Culture du virus HSV-1</p>	<p>-Contact direct avec le virus</p> <p>-Déversement de l'aliquot contenant le virus</p>	<p>- Inhalation et contact cutané avec le virus</p> <p>-Eclaboussures qui peuvent atteindre les yeux</p> <p>-Contamination du matériel et de l'espace du travail</p>	<p>3</p>	<p>3</p>	<p>9</p>	<p>-Travailler sous PSM au moins de classe II</p> <p>-Les masques FFP2, les gants étanches, et une blouse ont primordiaux</p> <p>-Le port des lunettes de protection est aussi obligatoire</p> <p>-Désinfecter le PSM, matériel et la paillasse avant et après la manipulation des virus</p> <p>-Les portoirs doivent être adaptés aux tubes de prélèvements</p>
-------------------------------	--	--	----------	----------	----------	--

Extraction	-Agitation des tubes	-Formation des aérosols -Inhalation -Déversement	3	3	9	-Dépôt des tubes dans un portoir adapté -Présence de lavabo à proximité au cas d'accident -Utilisation des EPIs
	Récupération des extraits	-Contact cutané - Renversement -Inhalation	3	1	3	-Utiliser des collecteurs de déchets liquides -Ports des EPIs
Préparation de mixte	-Agitation des tubes d'Eppendorf	-Contact cutané	3	1	3	-Vérification de bien fermer les tubes -Port des EPI
Mélange réactionnel	-Déversement	-Contact cutané	3	1	3	-Utiliser d'une paire de gants -déposer les tubes Dans un portoir adapté. -Utiliser les bonnes pratiques
Phase Post-Analytique						
Conservation	-Déversement du prélèvement	Formation des aérosols	1	2	2	-Port des EPIs

	-Vol des souches virales	-Act mal veillant : vol et diffusion	1	4	4	-Fermeture des congélateurs à clé -Un accès réglementé juste
--	--------------------------	--------------------------------------	---	---	---	---

						pour le personnel
-Tris des déchets	-Présence des déchets à risque infectieux	Contact cutané + Inhalation	2	3	6	-Port des EPIs -Installer un autoclave de paillasse -Former et informer le personnel au risque et moyens de prévention
-Stockage et élimination	-Durée de stockage -Elimination	- Contact cutané + inhalation	2	2	4	-Respecter les limites de la charge des conteneurs. -Respecter la durée limite du stockage -Accès restreint sauf pour le personnel de la gestion des déchets -Assurer la traçabilité de l'élimination des déchets

Conclusion et Perspective

Durant ce travail, on a utilisé la culture cellulaire qui est une méthode utile pour la recherche épidémiologique et virologique, elle sert à c'est tester des produits thérapeutiques et vérifier la toxicité de certains produits chimiques ainsi qu'elle est utilisée pour la production de certains vaccins par l'intermédiaire de la culture virale.

L'application des techniques de la culture cellulaire a été effectué en réalisant l'isolement, la production et le titrage de l'HSV-1 en utilisant la lignée cellulaire Vero E6.

Le titre infectieux est de 3,87 Log DICT50/ml vers le 6^{ème} jour, mais il déminue progressivement avec le temps et à température ambiante.

L'AMDEC est une méthode de référence pour la gestion des risques liés aux pratiques de culture cellulaire et virale. Il est recommandé de l'appliquer afin d'analyser, évaluer et prévenir les dangers qui peuvent arriver.

On peut également penser à purifier le virus Herpès Simplex-1 par des techniques de centrifugation et de purification des virus telles que l'Ultracentrifugation et la Précipitation par PEG.

Références Bibliographique:

- (2007). Dans C. C. Diane S. Leland, *Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology*.
- A. , R., A. , S., S., J., & D.K., D. (2014, Janvier 1). Herpes Keratitis. *Prog Retin Eye Res. Author manuscript*.
- A. Rice, S. (2021, Nov 30). Release of HSV-1 Cell-Free Virions: Mechanisms, Regulation,. *Viruses*.
- A. Rowe, A. S. (2013). Herpes Keratitis. Dans *Prog Retin Eye Res*.
- Alexander A. , D., Irina V., G., & Dmi. (2020, October 27). Cell Cultures for Virology: Usability, Advantages,. *International Journal for Molecular Sciences*.
- Andreia, L., Renata Matalon , N., & Daniela Teixeira, B. (2020). Medicine. *Study Protocol Clinical Trial*.
- Billie Ruth Bird, R., & Francis T. , F. (s.d.). *Basic Laboratory Techniques in Cell Culture*.
- Charis-P. , S., & Ludovic , V. (s.d.). *Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro*.
- Diane S., L., & Christine C. , G. (2007). Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*.
- Elad , M., Efi , M., Boaz , P., Tomer , I., & Orly , L. (2020). A Cell-Based Capture Assay for Rapid Virus Detection. *Viruses*.
- Elena Marcocci, M., Napoletani, G., Protto, V., & Kolesova, O. (2020, October). Herpes Simplex Virus-1 in the Brain: The Dark. *Trends in Microbiology*.
- frde. (1543). *ytgrf*. Test: Books.
- Genital Herpes. (2021, December 9). *JOURNAL OF MIDWIFERY & WOMEN'S HEALTH*.
- Guedj, M. (2018). *Mikbook 4ème édition*.
- Guedj, M. (2019). *Mikbook 4ème édition* .

Herpes Simplex Virus-1 in the Brain : The Dark Side of a Sneaky Infection. (2020).

Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL : Systematic Review of Recent Data. (2019).

J.Bradschaw, M., & Venkasten, A. (2016). Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology,Diagnosis, and Management. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics.*

J.Bradshaw, & Venkasten, A. (2016). Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults:Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics.*

J.Bradshaw, M., & Venkasten, A. (2016). Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology,. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics.*

Jie Z, H., Huan , L., & Bin, W. (2016). Immune response of T cells during herpes simplex. *Zhejiang University-SCIENCE .*

Jie ZHANG, H. L. (2017). Immune response of T cells during herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection .

Lauren A , A., Rista, U., Zachary , W., & Barry J , M. (2021). Current Drugs to Treat Infections with Herpes Simplex Viruses-1 and -2. *Viruses.*

Lauren A. , S., Rista , U., Zachary W. , G., & Barry , J. (2021). Current Drugs to Treat Infections with Herpes Simplex. *Viruses.*

Lauren A. Sadowski, R. U. (2021). *Current Drugs to Treat Infections with Herpes Simplex Viruses-1 and -2.*

Lulia , K., Rahul K. , S., & Deepak , S. (2019). Pathological processes activated by herpes simplex virus-1. *Cell Mol Life Sci. Author Manuscript.* doi:10.1007/s00018-018-2938-1.

Lulia Koujah, R. K. (2019). *Pathological processes activated by herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in the cornea.*

M. K. , K., A. N. , K., & S. N. , K. (2014). Human Herpes Simplex Virus:. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii.*

- Michael J. Bradshaw, A. V. (2016). Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults : Pathophysiology, Diagnosis, and Management.
- Oren , K., & Amichay , A. (2021). The Fate of Incoming HSV-1 Genomes. *Curr. Issues Mol. Biol.* doi:<https://doi.org/10.21775/cimb.041.221>
- Pamela , C., Joseph V , B., Andrew C, K., & Sheila F, F. (2009). Herpes simplex. *Pediatrics in Review.*
- Pamela Chayavichitsilp, J. V. (2009). Herpes Simplex.
- Petiot, E. (2018). Procédés de cultures de cellules VERO en milieu sans sérum: contributions au développement d'une stratégie.
- Rice, S. A. (2021). Release of HSV-1 Cell-Free Virions : Mechanisms, Regulation, and Likely Role in Human-Human Transmission.
- Richard , W., & Joel , B. (2022, Mars 31). Clinical management of herpes simplex virus infections: past,. *F1000Research.*
- Richard Whitley, J. B. (2018). Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present and future.
- Salvatore, C., Luca , F., Alberto , B., Cesare , D., & Giulia , A. (2019). Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL: Systematic Review of Recent Data. *Viruses.*
- Shuyong , Z., & Abel , V.-B. (2021). Pathogenesis and virulence of herpes simplex. *Virulence.* doi:10.1080/21505594.2021.1982373
- Shuyong Zhu, A. V.-B. (2021). Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus.
- test. (s.d.). test. *test.*
- Treatment of herpes labialis by photodynamic therapy. (2020).

