جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES
كلية العلوم والتقنيات فاس
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FÈS

N° d'ordre : 87/2023

Centre des Etudes Doctorales : Sciences et Techniques et Sciences Médicales
Formation Doctorale : Sciences et Génie de la matière, de la terre et de la vie (SGMTV)
Discipline : Biotechnologie et développement régional
Spécialité* : Microbiologie et Biotechnologie
Laboratoire : Laboratoire d'Ecologie fonctionnelle et Génie de l'Environnement (LEFGE)

Thèse Pour l'Obtention de Doctorat

Titre de la thèse :

Contribution à l'amélioration du procédé de production de vaccins contre les Capripoxvirus des Ruminants

Préparée par : RHAZI Halima

Soutenue le 20 novembre 2023

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Etablissement	Qualité
Pr. EL GHADRAOUI Lachen	PES	FST- Fès	Président
Pr. BEKHTI Khadija	PES	FST- Fès	Rapporteur
Pr. DILAI Mohamed	PH	IAV Hassan II Rabat	Rapporteur
Pr. ERRACHIDI Faouzi	PH	FST- Fès	Rapporteur
Pr. FASSI FIHRI Ouafaa	PES	IAV Hassan II Rabat	Examinateur
Pr. LAZRAQ Abderrahim	PES	FST- Fès	Examinateur
Pr. MIKOU Karima	PES	FST- Fès	Directrice de thèse
Dr. ELHARRAK Mehdi	Docteur	MCI Santé animale-Mohammedia	Invité

Sommaire

Dédicaces i

Remerciements ii

Préface iii

Résumé v

Abstract vi

ملخص vii

Liste des figures et Tableaux viii

Liste des figures et Tableaux des Articles x

LISTE DES abréviations xiv

Introduction Générale 1

Revue Bibliographique 5

1. Généralités sur les Capripoxvirus 5

2. Structure et Biologie des Capripoxvirus 6

3. Pathogenèse et transmission des Capripoxvirus 7

3.1. Pathogenèse des CaPVs 7

3.2. Transmission des Capripoxvirus 8

4. Historique et distribution géographique des Capripoxvirus 10

5. Impact économique 12

6. Technique de contrôle des Capripoxvirus 13

6.1. Contrôle cellulaire : Isolement viral sur culture cellulaire 13

6.2. Détection et identification des virus par les tests sérologiques 15

6.3 Détection et identification des virus par les tests moléculaires 19

6.4 Autres tests de détection et identification des CaPVs 21

7. Eradication et contrôle des Capripoxvirus 21

7.1 Vaccins contre le virus Lumpy Skin Disease 22

7.2 Vaccins contre les virus Sheeppox et Goatpox 24

7.3 Production des vaccins viraux 26
7.4 Etude d'efficacité des vaccins contre les CaPVs 40
Partie pratique 41
Comparative sensitivity study of primary cells, vero, OA3.Ts and ESH-L cell lines to lumpy skin disease, sheeppox, and goatpox viruses' detection and growth 41
Doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114164. Epub 2021 Apr 14 41
Chapitre I : Développement du substrat cellulaire pour l'isolement, la propagation et la production des Capripoxvirus 42
1. Détermination de cellules alternatives et efficaces pour l'isolement et la propagation des Capripoxvirus 43
2. Développement des cellules diploïdes pour la production des Capripoxvirus 51
Chapitre II : Amélioration du processus de production de l'antigène des Capripoxvirus 67
1. Optimisation du système de production de l'antigène des Capripoxvirus 67
2. Effet des phytohormones sur la qualité du milieu de culture cellulaire 80
Chapitre III : Evaluation de l'efficacité des vaccins des Capripoxvirus 103
Discussion générale 112
Conclusion et Perspectives 122
Références bibliographiques 124

Dédicaces

A mes très chers parents

Le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'ont pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, dont la prière et la bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Rien au monde ne saurait être assez éloquent pour exprimer ce que vous méritez pour tous ce que vous ne cessez de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Ce travail est le fruit de vos sacrifices.

A mes frères

Pour votre soutien et encouragements présents dans tous mes moments d'examens par vos belles surprises sucrées. Vous occupez une place particulière dans mon cœur. Je vous dédie ce travail en vous souhaitant un avenir plein de joie, de réussite et de sérénité.

A mon cher oncle

Celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de mon parcours mon oncle Abdessalam, qui m'accueillit à bras ouverts dans sa famille. En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous, je vous dédie ce travail avec ma reconnaissance pour tous vos efforts.

A mes chers amis

En souvenir de nos éclats de rire et des bons moments. En souvenir de tout ce qu'on a vécu ensemble. J'espère de tout mon cœur que notre amitié durera éternellement. A tous ceux qui me sont chers

A tous mes enseignants

Leur générosité et leur soutien m'obligent de leur témoigner mon profond respect et ma loyale considération.

A tous ceux qui me sont chers.

A la mémoire de ma grande mère

Je dédie mon travail À ma mère, source d'inspiration et de motivation

REMERCIEMENTS

Je remercie vivement Docteur Khalid OMARI TADALOUI, Directeur Général de MCI Santé Animale, de m'avoir offert l'opportunité d'intégrer le monde de la recherche scientifique et de m'avoir permis d'entamer et de poursuivre mon travail de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et gratitude. Je remercie Professeur IJAALI, Doyen de la faculté des sciences et techniques de Fès. J'adresse mes sincères remerciements au Professeur EL Hadrami, Directeur du Centre d'Etudes Doctorales de l'Université Sidi Mohammed de Fès. Mes sincères remerciements s'adressent également au Professeur ELGHADRAOUI, Directeur du laboratoire Ecologie fonctionnelle et Génie de l'environnement (LEFGE), de m'avoir acceptée pour la réalisation de ce travail de thèse.

Je remercie vivement ma directrice de thèse, Professeur Karima MIKOU pour l'encadrement et le soutien apportés tout au long de ce travail, sa disponibilité et ses précieux conseils. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et mon respect. J'adresse mes profonds remerciements au Docteur Mehdi EL HARRAK, pour la direction et l'encadrement de ma thèse. Je le remercie également pour la transmission de ses connaissances, sa disponibilité, son sens de la rigueur et l'intérêt qu'il a apporté à mon travail. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Je remercie le personnel de MCI Santé Animale qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je Tiens à remercier également les Professeurs membres de jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail.

Je ne terminerai pas sans exprimer mes remerciements envers mes meilleures amies Meryem Alhyane, Imane Kabli, Ghizlane Khabbaz et Zguini Chaymae qui étaient toujours près de moi, en pensées, et à mes côtés. Enfin je tiens à remercier toutes les personnes intéressées par mon travail et tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près, à réaliser ce travail

Merci !.

Préface

Cette thèse est l'aboutissement de mon parcours dans l'enseignement supérieur. Elle a été rédigée afin de remplir les exigences d'obtention du diplôme de doctorat.

Cette thèse intitulée « Développement des cellules pour la production et contrôle de qualité des Capripoxvirus » est présentée en accord avec les connaissances accumulées lors de ma formation universitaire et d'expériences personnelles ; elle a été réalisée sous la direction du Professeur Karima MIKOU du laboratoire LEFGE de la FST de Fès et du Docteur Mehdi EL HARRAK du laboratoire de recherche et développement virologique à la MCI-Sante animale à El Mohammadia. L'objectif principal de ce projet de thèse était une recherche de cellules pour la production des Capripoxvirus en remplacement des cellules des testicules d'agneau qui servaient à la production de ces virus ; mais qui, outre l'obligation de la castration des animaux, la production des vaccins à partir des cellules des testicules d'agneau demandait de grands efforts du fait que la congélation et la conservation de ces cellules sont impossibles et donc La production des antigènes CaPVs est difficile et couteuse par rapport aux autres virus, de plus le suivi de la réponse immunologique après vaccination est seulement qualitatif et ne donne pas une idée précise sur l'état des anticorps chez l'animal. Notre objectif était donc de répondre à toutes les contraintes qui confrontent la production des vaccins contre les Capripoxvirus.

La recherche était complexe, mais elle m'a permis de répondre à la problématique de manière détaillée et pour la plupart des étapes de production. Les résultats trouvés au cours de la préparation de cette thèse ont donné lieu aux publications suivantes :

1. . **Rhazi, H**., Safini, N., Mikou, K., Alhyane, M., Lenk, M., 2021. Comparative sensitivity study of primary cells, Vero, OA3. Ts and ESH-L cell lines to lumpy skin disease, Sheepox, and Goatpox viruses' detection and growth. J. Virol. Methods 293, 114164. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114164 no. April.

2. **Rhazi, H.,** Safini, N.; Mikou, K., Alhyane, M., Tadlaoui, K.O., Lin, X., Venkatesan, N.P., Elharrak, M. Production of Small Ruminant Morbillivirus, Rift Valley Fever Virus and Lumpy Skin Disease Virus in CelCradle ^{TM} -500A Bioreactors. **2021**, 1–9.

3. **Rhazi, H.;** Mikou, K.; Sadeqy, Y.; Alhayane, M. Evaluation of ELISA and VNT for Sheeppox Virus Antibody Detection and Development of an Immunoenzymatic Quantitative Method. *J Immunol Methods* **2022**, *502*, 113226, doi: 10.1016/j.jim.2022.113226.

4. **Halima Rhazi** , Ikram Tifrouin , Karima Mikou , Oumaima Belayadi , Najete Safini , Meryem Alhyane , Khalid Omari Tadlaoui , Matthias Lenk , Mehdi Elharrak. Poxvirus sensitivity of a novel diploid sheep embryonic heart cell line. Arch.Virol. **2023**, 168 (9):232. doi: 10.1007/s00705-023-05855-x.

5. **Halima Rhazi**, Mehdi Elharrak, Hossam Hilal El Idrissi, Meryeme Alhyane, Khalid Omari Tadlaoui, Karima Mikou. Growth kinetics and morphological characteristics of Vero and primary heart cells treated with the plant hormones Auxin, Kinetin, and Gibberellin, soumis pour publication

6. Safini N, Elmejdoub S, Bamouh Z, Jazouli M, Hamdi J, Boumart Z, **Rhazi H**, Tadlaoui KO, El Harrak M. Development and Evaluation of a Combined Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP) and Lumpy Skin Disease (LSD) Live Vaccine. Viruses. 2022 Feb 11;14(2):372. doi: 10.3390/v14020372. PMID: 35215965; PMCID: PMC8880402.

Résumé

Le présent travail est une contribution à l'amélioration du processus de fabrication des vaccins contre les Capripoxvirus (CaPVs) de la famille des Poxviridae. Ces virus sont à l'origine de la clavelée ovine, la variole caprine et de la dermatose nodulaire bovine qui sont des maladies contagieuses infectant les ovins, caprins et bovins et causant des pertes économiques considérables. Néanmoins, la vaccination reste un moyen efficace pour la prévention et l'éradication des maladies causées par ces virus. De ce fait, l'amélioration du processus de production de vaccin est essentielle et implique des recherches sur les cellules permissives, le milieu de culture et le système de production.

Quatre types de cellules primaires (cellule de cœur, de peau, de testicule et de rein d'agneau) et 3 lignées cellulaires (Vero, OA3.Ts et ESH-L) sont testés pour la sensibilité, l'isolement, le control et le titrage des CaPVs. Nos résultats montrent que les cellules ESH-L et les cellules embryonnaires primaires du cœur d'agneau sont les plus permissives pour la croissance et la détection des CaPVs. Cependant, les cellules embryonnaires du cœur présentent un rendement cellulaire plus important par rapport aux cellules ESH-L mais ces dernières peuvent être maintenues 20 passages plus que les cellules du cœur. Des cellules diploïdes sont également préparées à partir du tissu embryonnaire du cœur. Ces cellules peuvent atteindre le passage 45 ; elles sont également plus sensibles aux Poxvirus avec des titres élevés (7/ml) en comparaison avec les autres lignées cellulaires. De plus, ces cellules peuvent être conservées dans de l'azote liquide jusqu'à 730 jours avec une viabilité cellulaire de 81%.

La densité et la viabilité cellulaire ont pu être améliorées par l'ajout des phytohormones (auxine, kinétine et gibbérelline) dans le milieu de culture. Nos résultats ont montré que la Gibbérelline est le stimulateur le plus puissant des cellules du cœur (200 000 cell/cm^2) et les cellules Vero sont les plus sensibles à la kinétine (180 000 cell/cm^2).

Un nouvel système CelCradle™-500A, pour la réplication d'un des CaPVs (LSDV), est testé en vue de remplacer les systèmes conventionnels de production. Ce système a donné une densité cellulaire importante (3.04×10^9 cell/cm^2 pour les cellules Vero, et 6.7×10^8 cell/cm^2 pour les cellules primaires LT). Enfin, l'efficacité de toutes les méthodes de contrôle des vaccins contre les CaPVs est étudiée, nos résultats ont montré que la meilleure méthode de détection et de quantification des anticorps est la méthode de neutralisation du virus (VNT) qui donne une sensibilité plus importante par rapport à l'ELISA (70% de sérums testés positifs ont été détecté par VNT contre 48% par ELISA). De plus, l'utilisation des cellules primaires pour VNT est une opération lourde et chronophage ; elle pourrait être avantageusement remplacée par des cellules ESH-L et la technique de révélation immunoenzymatique, basée sur le sérum anti-SPPV, a ajouté une spécificité au VNT.

En conclusion, les cellules ESH-L et les cellules primaires embryonnaires du cœur d'agneau sont les cellules les plus sensibles pour la propagation des CaPVs. Les cellules embryonnaires du cœur purifiées sont des cellules meilleures pour la production des antigènes des Poxvirus. Le système de production CelCradle™-500A est plus efficace que les systèmes conventionnels pour la fabrication des vaccins à base des antigènes des CaPVs, cette dernière peut être améliorée par l'ajout des phytohormones au milieu de culture cellulaire. La méthode de VNT additionnée de l'anticorps spécifique est la meilleure technique pour la détection et la quantification des anticorps post vaccination

.

Mots clés : *Capripoxvirus**,** processus de production, cellules embryonnaires du cœur d'agneau, phytohormones, méthodes de contrôle de réponse vaccinale.*

Abstract

The current research makes a contribution to the process of producing vaccines against Capripoxviruses (CaPVs), a member of the Poxviridae family. These viruses are the cause behind sheep pox, goat pox, and lumpy skin disease in cattle, all of which are transmittable diseases that affect sheep, goats, and cattle and result in significant financial losses. Nevertheless, vaccination is still a powerful tool for both preventing and curing diseases brought on by these viruses. Therefore, it is essential to improve the vaccine production process, which involves studying permissive cells, medium cultures, and production systems**.**

Three cell lines (Vero, OA3.Ts, and ESH-L) and four primary cell types (heart, skin, testis, and lamb kidney cell) were tested for sensitivity, isolation, diagnosis, and CaPVs titration. Our findings indicate that primary embryonic lamb heart cells and ESH-L cells are the most reactive to growth and detection of CaPVs. Compared to ESH-L cells, embryonic heart cells produce more cells, although ESH-L cells can be sub**-**cultured for 20 more passages than heart cells.

From embryonic cardiac tissue, pure diploid cells have been generated. These cells have a passage 45 maximum and, in comparison to other cell lines, are more sensitive to Poxviruses with high titers (7/ml). Additionally, these cells have a cell viability of 80% and may be kept in liquid nitrogen for up to 730 days with a cell viability of 81%.

Adding phytohormones (auxin, kinetin, and gibberellin) to the culture medium could boost cell density and vitality. According to our findings, Gibberellin is the most potent stimulator of embryonic heart cells (200,000 cells/cm2), while Vero cells are the most sensitive to kinetin (180,000 cells/cm2).

A new CelCradleTM-500A system is being tested for the replication of one of the CaPVs (LSDV), with the goal of replacing conventional production systems. The cell density in this system was high (3.04 109 cell/cm2 for Vero cells and 6.7 108 cell/cm2 for LT primary cells). Finally, the effectiveness of all techniques of vaccination control against CaPVs is examined, and our findings indicate that the virus neutralization technique (VNT) provides the best sensitivity for antibody detection and quantification. Compared to ELISA, VNT detected 70% of positive sera (70% vs 48% for ELISA). Furthermore, using primary cells for VNT is a time-consuming and inefficient procedure that might be substituted by ESH-L cells, and the immunoenzymatic revelation technique based on anti-SPPV serum has increased the specificity of the VNT.

In conclusion, the most sensitive cells for the propagation of CaPVs are ESH-L cells and primary embryonic lamb heart cells. The production of Poxvirus antigens works better when conducted with purified embryonic cardiac cells. For the manufacturing of vaccines based on CaPVs antigens, the CelCradleTM-500A production method is more effective than conventional systems; the latter can be improved by adding phytohormones to the cell culture medium. The best method for detecting and quantifying post-vaccination antibodies is the VNT method combined with the specific antibody.

Keywords: *phytohormones, lamb embryonic heart cells, Capripoxvirus, production process, vaccine effectiveness, methods of control of vaccinal response.*

ملخص

يعد العمل الحالي بمثابة مساهمة في تحسين عملية تصنيع اللقاحات ضد فيروسات كابري بوكس (Cap Vs) لعائلة Poxviridae. هذه الفيروسات هي المسببة لمرض جدري الأغنام وجدري الماعز ومرض الجلد العقدي البقري، وهي أمراض معدية تصيب الأغنام والماعز والأبقار وتسبب خسائر اقتصادية كبيرة. ومع ذلك، يظل التطعيم وسيلة فعالة للوقاية من الأمراض التي تسببها هذه الفيروسات والقضاء عليها. لذا، يعد تحسين عملية إنتاج اللقاح أمرًا ضروريًا مع إجراء أبحاث على الخلايا المسموح بها ووسط الاستزراع ونظام الإنتاج.

يتم اختبار أربعة أنواع من الخلايا الأولية (قلب الحمل والجلد والخصية وخلايا الكلى) و3 خطوط خلايا (Vero وOA3.Ts وESH-L) من أجل الحساسية والعزل والتشخيص ومعايرة CaPVs. تظهر نتائجنا أن خلايا ESH-L والخلايا الجنينية لقلب الضأن الأولية هي الأكثر تساهلاً لنمو واكتشاف CaPVs. ومع ذلك، فإن خلايا القلب الجنينية لديها إنتاجية أكبر من الخلايا مقارنة بخلايا ESH-L ولكن يمكن الحفاظ على الأخيرة لمدة 20 مقطعًا أطول من خلايا القلب. يتم أيضًا تحضير الخلايا الثنائية الصبغية من أنسجة القلب الجنينية. يمكن أن تصل هذه الخلايا إلى الممر 45؛ كما أنهم أكثر حساسية لفيروسات الجدري ذات التتر العالي (7/مل) مقارنة بخطوط الخلايا الأخرى. بالإضافة إلى ذلك، يمكن تخزين هذه الخلايا في النيتروجين السائل لمدة تصل إلى 730 يومًا مع قدرة الخلية على البقاء بنسبة 81%.

يمكن تحسين كثافة الخلية وقدرتها على البقاء عن طريق إضافة الهرمونات النباتية (أوكسين، كينيتين وجبريلين) إلى وسط الثقافة. أظهرت نتائجنا أن الجبرلين هو أقوى منشط لخلايا القلب (200000 خلية/سم2) وخلايا فيرو هي الأكثر حساسية للكينيتين (180000 خلية/سم2).

ويجري حاليًا اختبار نظام CelCradle™-500A الجديد، لتكرار أحد مركبات CaPVs (LSDV)، بهدف استبدال أنظمة الإنتاج التقليدية. أعطى هذا النظام كثافة خلية كبيرة (3.04 × 10 خلية/سم2 لخلايا فيرو، و6.7 × 108 خلية/سم2 لخلايا LT الأولية). وأخيرا، تمت دراسة فعالية جميع طرق مكافحة اللقاحات ضد CaPVs، وأظهرت نتائجنا أن أفضل طريقة للكشف عن الأجسام المضادة وقياس كميتها هي طريقة تحييد الفيروس (VNT) التي تعطي حساسية أكبر مقارنة بـ ELISA (70٪ من الأمصال كانت إيجابية تم اكتشافها بواسطة VNT مقارنة بـ 48% بواسطة ELISA). وعلاوة على ذلك، فإن استخدام الخلايا الأولية لـ VNT عملية مرهقة وتستغرق وقتًا طويلاً؛ يمكن استبداله بشكل مفيد بخلايا ESH-L، كما أضافت تقنية الكشف الإنزيمي المناعي، المستندة إلى مصل مضاد لـ SPPV، خصوصية إلى VNT.

في الختام، خلايا ESH-L وخلايا قلب الحمل الجنينية الأولية هي الخلايا الأكثر حساسية لانتشار CaPVs. تعتبر خلايا القلب الجنينية النقية خلايا أفضل لإنتاج مستضدات فيروس الجدري. يعد نظام الإنتاج CelCradle™-500A أكثر كفاءة من الأنظمة التقليدية لتصنيع اللقاحات المعتمدة على مستضدات CaPVs، ويمكن تحسين هذه الأخيرة عن طريق إضافة الهرمونات النباتية إلى وسط زراعة الخلايا. تعد طريقة VNT المكملة بالجسم المضاد المحدد هي أفضل تقنية للكشف عن الأجسام المضادة بعد التطعيم وتحديد كميتها.

<u>الكلمات المفتاحية</u>: فيروس كابريبوكس، عملية الإنتاج، خلايا قلب الحمل الجنينية، الهرمونات النباتية، طرق تشخيص فعالية اللقاح.

Liste des figures et Tableaux

Figure 0-1. Arbre phylogénétique des poxvirus [29]…….06

Figure 0-2. Structure génomique du Capripoxvirus : enveloppée, en forme de brique et 300 3 270 3 200 nm. La membrane superficielle présente des tubules superficiels ou des filaments superficiels. Il existe deux particules virales infectieuses distinctes : le virus mature intracellulaire et le virus enveloppé extracellulaire [37].07

Figure 0-3. Distribution géographique de LSDV en 2020 [65]……...10

Figure 0-4. Distribution géographique de SPPV et GTPV en 2020 [65]…….11

Figure 5. Schéma explicative des différentes étapes de la production des vaccins Capripoxvirus……
…..25

Figure 6. 1. Schéma expliquant les différentes parties du bioréacteur avec agitation pneumatique **2**. Photo réelle du bioréacteur avec agitation pneumatique [200]…….29

Figure 7. Schéma expliquant les différentes étapes de la mise à grande échelle [209]…….30

Figure 8. 1. Schéma expliquant le principe du bioréacteur à membrane à fibres creuses utilisé pour la culture et la croissance cellulaire : (a) les cellules sont cultivées dans l'espace extracapillaire, (b) les cellules sont cultivées dans le lumen de la fibre, [217]. **2.** Photo réelle du bioréacteur à fibres creuses [218]…….31

Figure 9. 1- Culture tridimensionnels (3D) dans le bioréacteur à paroi rotative ; (A) Les cellules sont cultivées à confluence dans des cultures cellulaires monocouches conventionnelles bidimensionnelles (2D), sont ensuite combinés avec des billes de microporteurs et le milieu de culture dans le bioréacteur. (B) L'aspect de différent type d'agrégats cellulaire. 2- photo réelle du bioréacteur rotatif [221, 224]……..32

Figure 10. 1-Shema explicative de bioréacteur Wave, **2-** Photo réelle du bioréacteur Wave

[227]……
…..33

Figure 11. 1- Bioréacteur a lit fixe à grande échelle. **2-** Bioréacteur a lit fixe à l'échelle laboratoire. **3-** Schéma explicative du principe du bioréacteur à lit fixe [237]……..34

Tableau 1. Vaccins commercialisés contre les Capripoxvirus [152]……22

Tableau 2 . Souches virales de SPPV et GTPV et nombre de passage d'atténuation [36]……24

Tableau 3. Composition d'un milieu minimum essentiel (MEM)

[260]……...34

Liste des figures et Tableaux des Articles

Article 1: Comparative sensitivity study of primary cells, Vero, OA3. Ts and ESH-L cell lines to lumpy skin disease, Sheepox, and Goatpox viruses' detection and growth

Figure 1. Immunostaining of CaPVs produced on ESH-L cells. A: CPE of LSD virus/ESH-cell. B: CPE IPMA staining of LSD virus/ESH-L cells. C: CPE IFA staining of LSD virus/ESH-L cells……47

Figure 2. CaPVs localization in ESH-L cells. A: SPPV virus ESH-L cells. B: GTPV in ESH-L cells. C: LSD in ESH-L cells (x200)……...47

Figure 3. Kinetics of Extracellular and Intracellular Capripoxviruses on ESH-L cells…….47

Table 1. Primary lamb cells maximum passages……46

Table 2. Results of qPCR positive clinical samples passed on LT and ESH-L cells for virus detection…….46

Table 3. Capripoxviruses titers on primary cells (Heart/Skin/Kidney/Testis) Cells, ESH-L, Vero and OA3.Ts cell lines……...47

Article 2: Poxvirus Sensitivity of a Novel Diploid Sheep Embryonic Heart Cell Line

Figure 1. Sheep embryonic heart cells on (A) day 5 (100×), (B) day 8 (40×), (C) day 12 (40×), and (D) day 18 (40×) after preparation and purification…….52

Figure 2. Morphological identification of sheep embryonic heart cells by Grunwald–Giemsa staining. (A) 40×, (B) 100×, (C) 200×, (D) 400×, (E) 600×, (F) 1000×…….52

Figure 3. Viability of sheep embryonic heart cells after varying periods of cryopreservation in liquid nitrogen…….53

Figure 4. Growth kinetic of sheep embryonic heart cells……...53

Figure 5 Sheep embryonic heart cell yield after 40 passages…….54

Fig. 6. The cytopathic effect (CPE) of (A) orf virus, (B) Camelpox virus, and (C) lumpy skin disease virus (LSDV) on sheep embryonic heart cells. (D) Uninfected control. Magnification: 200×……58

Fig. 7. Immunoperoxidase-stained sheep embryonic cells heart (A and B) and primary lamb testis cells (C and D) without infection (A and C) or after infection with LSDV (B and D). Magnification: 100×……59

Table 1. Cellular proprieties of EH, ESH-L, and LT cells…….58

Table 2. Poxvirus titers in sheep embryonic heart cells on 40 passages……59

Table 3. Poxvirus titers in sheep embryonic heart (EH) cells, primary lamb testis (LT) cells, embryonic sheep skin (ESH-L) cells, OA3.Ts cells, and Vero cells……..59

Article 3: Production of small ruminant morbillivirus, rift valley fever virus and lumpy skin disease virus in CelCradle™ -500A bioreactors

Fig. 1. Kinetics of Vero cell growth in medium supplemented by 5% (5F, blue), 3% (3F, grey), and 1% (1F, yellow) FBS in the CelCradle™ -500A……70

Fig. 2. Kinetics of LT cell growth in medium supplemented with 10% FBS in the CelCradle™ -500A…….70

Figure 3. a Kinetics of Vero cell growth in 1% FBS-containing media and PPR virus titer. **b** Comparison of titers between extracellular and intracellular virus……..71

Figure 4. a Kinetics of Vero cell growth in 1% FBS –containing media, and RVF virus **b** Comparison of titers between extracellular and intracellular virus……..72

Figure 5. Kinetics of LT cell growth in 10% FBS containing media and LSD virus titers **B**. Comparison of titers between extracellular and intracellular virus……..73

Table 1. Comparison of cell densities between Cell Factory and CelCradle™ - 500A culture systems……71

Table 2. Comparison of viruses' titers and incubation time using Cell Factories and CelCradle systems……73

Article 4: Growth kinetics and morphological characteristics of Vero and primary heart cells treated with the plant hormones Auxin, Kinetin, and Gibberellin

Figure 1. Effect of the optimal concentration of Auxin, Gibberellin and Kinetin on Heart and Vero cell……...93

Figure 2. Effect of phytohormones on Heart and Vero cells growth kinetics……95

Figure 3. Effect of Kinetin (A, E), Gibberellin (B, F) and Auxin (C, G) on Heart and Vero cells. D: control of Heart cells, H: Control of Vero cells……...95

Figure 4. Glucose of Vero and Heart cell cultures with phytohormones……...95

Table 1. MTT assay results of Heart and Vero cell cultured with different concentration of phytohormones……96

Table 2. Cell viability enhancement by the three phytohormones…….....96

Table 3. pH of Vero and Heart cell cultures with phytohormones…….....96

Article 5: Evaluation of ELISA and VNT for Sheeppox virus antibody detection and development of an immunoenzymatic quantitative method

Figure 1. Correlation between VNT and ELISA for detection of SPPV antibodies (strong positive (orange), weak positive (blue), doubtful (yellow) and negative (grey)). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)……...105

Figure 2. Correlation between VNT results on OA3.Ts/LT and ESH-L/LT cells……...105

Table 1. Sensitivity and specificity of ELISA in comparison with VNT…….104

Table 2. Averages of antibody titer obtained by VNT, IPMA and IFA on 100 SPPV positive sera……..... 105

Table 3. Statistical significance calculated between tests……105

LISTE DES abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGPT : Agar Gel Precipitation Test (Test de précipitation sur gel d'Agar)

ARN : Acide Ribonucléique

ATCC: American Type Culture Collection

AVK 58: Adult Vervet Monkey Kidney (Rein de singe vervet adulte)

BVD: Bovine Viral Diarrhea (Diarrhée virale bovine)

BHK21: Baby Hamster Kidney (Rein de bébé hamster)

CAM: Chorioallantoic Membrane

Capv: Capripoxvirus

CEV: Cell- enveloped virions (Virions enveloppés associés aux cellules)

CFSPH: Center for Food Security and Public Health (Centre pour la sécurité alimentaire et la santé publique)

ChPV: Chordopoxvirus

CIE: Compteur immunoélectrophorèse

DICT50/TCID50 :Dose infectant 50% des Cultures de Tissu

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Diméthylsulfoxyde

Dpi : Day post infection (jour suivant infection)

ECP : Effet Cyto Pathogène

ECE : Embryonated chicken eggs (œufs de poule embryonnés)

EDTA : Ethylene diamine tetraacetic acid

EEV : Extracellular enveloped virions (Virions enveloppés extracellulaires)

EFSA : European Food Safety Authority (Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire)

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dosage immuno-enzymatique)

FAO: Food and Agriculture Organisation (Organisation pour l'alimentation et l'agriculture)

FBS: Foetal Bovin Serum (Sérum fœtal bovin)

GTPV: Goatpoxvirus

HIS: Hyperimmune serums (Sérum hyperimmun)

HEK293: Human embryonic kidney (Rein embryonnaire humain)

IC-ELISA : immuno-capture d'ELISA

IEV : Intracellular enveloped virions (Virions enveloppés intracellulaires)

IFA : Immunofluorescence indirecte

IMV : Intracellular mature virions (Virions matures intracellulaires)

IPMA : Immunoperoxydase Monolayer Assay (Test monocouche d'immunoperoxydase)

IV: Immature virions (Virions immatures)

KSGP: Kenyan Sheep Goatpox (Goatpox du mouton du Kenya)

LAMP : Loop-mediated isothermal amplification (Amplification isotherme médiée par boucle)

LSD : Lumpy Skin Disease (Maladie cutanée nodulaire)

LSDV : Lumpy Skin Disease Virus (Virus de la maladie cutanée nodulaire)

LK : Lamb kidney cells (Cellules de rein d'agneau)

LT : Lamb testis cells (Cellules de testicule d'agneau)

MDBK: Madin Darby Bovine Kidney (Rein de bovin Madin Darby)

MEM : Milieu essentiel minimum

Mm : Millimolaire

MV : Mature virion (Virion mature)

MOI : Multiplicity of infection (Multiplicité des infections)

NASA: National Aeronautics and Space Administration (Administration Nationale de l'Espace et de l'Aéronautique)

OA3. Ts : Ovine testis cell line (Lignée cellulaire de testicule ovin)

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

OMSA : Organisation Mondiale de la Santé animale

ONSSA: Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires

PBS: Phosphate buffered saline (Solution saline tamponnée au phosphate)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase)

PPR : Peste des Petits Ruminants

qPCR : Quantitative PCR (PCR quantitative)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction).

RT-Lamp PCR: Reverse Transcriptase Loop-mediated isothermal amplification

RCCS : Bioréacteur rotatif de culture cellulair

RPHA : le test d'hémagglutination passive en phase inverse

RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR (PCR après transcription inverse)

RVF : Rift Valley Fever (Fièvre de la vallée du Rift)

RWVB: Rotating wall bioreactor (Bioréacteur à paroi rotative)

SN: Séroneutralisation

SPPV: Sheeppox virus

SRH: Single radial hemolysis (Test d'hémolyse radiale)

SRID: Single radial immunodiffusion assay (Test d'immunodiffusion radiale)

TGF : Transforming growth factors (Facteurs de croissance transformant)

VACV : Vaccinia Virus

Vero: Verda Reno (Lignée cellulaire extraites de cellules épithéliales de rein d'un singe vert africain)

VNT : Virus neutralization (Neutralisation du virus)

WAHIS: World Animal Health Information System (Système mondial d'informations zoosanitaires

Introduction Générale

Les Capripoxvirus (CaPVs) représentent l'un des huit genres dans la sous-famille des chordopoxvirus (ChPV) des *Poxviridae*. Le genre Capripoxvirus comporte actuellement le virus Sheeppox (SPPV), le virus Goatpox (GTPV) et le virus de la Lumpy Skin Disease (LSDV). Les SPPV, GTPV et LSDV sont responsables respectivement de la clavelée ovine, de la variole caprine et de la dermatose nodulaire contagieuse bovine [1]. Ces trois virus sont répandus dans une grande partie du globe et engendrent des pertes économiques considérables par des maladies sévères, caractérisées par de la fièvre, des écoulements nasaux et oculaires et des lésions cutanées et pulmonaires. Les taux de morbidité et de mortalité peuvent atteindre respectivement 80% et 10% chez les petits ruminants. Chez les bovins, la morbidité varie entre 5 et 80% et la mortalité est d'environ 3% [2,3].

Au fil des années, le SPPV et le GTPV se sont répandus en Afrique, au Moyen-Orient, en Asie ainsi qu'en Europe où de récents foyers ont été signalés [4,5]. Le virus LSD a d'abord été confiné en Afrique australe, puis s'est répandu au Moyen-Orient, en Asie du Sud et en Europe à travers la Turquie. Au Maroc, la clavelée ovine revêt une importance économique à travers des pertes directes et indirectes. Les pertes directes se définissent par la mortalité élevée des jeunes, les avortements et la dépréciation de la valeur économique des peaux et de la laine. Les pertes indirectes sont dues à la chute de production, au coût de la prophylaxie et aux contraintes liées à la commercialisation des animaux et de leurs dérivés [6].

Ces maladies infectieuses émergentes représentent un ultime défi pour les vétérinaires et les virologues de développer en continu de nouvelles stratégies prophylactiques et mesures de contrôle pour l'éradication. Certains pays peuvent adopter l'abattage systématique des animaux infectés, la restriction du mouvement des animaux ou la mise en quarantaine des animaux importés. Cependant, les Capripoxvirus ne peuvent être éradiqués ou contrôlés sans mener des campagnes de vaccination régulières avec une large couverture vaccinale et l'utilisation d'un vaccin efficace [7]. En effet, la vaccination reste le moyen le plus efficace pour lutter contre ces maladies. A ce jour, seuls les vaccins vivants atténués sont commercialisés mais la protection procurée reste controversée vis-à-vis de chaque espèce et dépend essentiellement de la souche vaccinale utilisée, de son origine et de son niveau d'atténuation.

Afin de développer un vaccin efficace contre une maladie précise il faut développer le processus de production qui se compose de la phase up Stream et down Stream. De plus, les méthodes d'étude de son efficacité jouent un rôle primordial dans son développement. La phase up Stream se concentre sur la production de l'antigène viral à partir d'un lot primaire qui va être par la suite traité dans la phase down Stream afin de délivrer le vaccin final.

Pour avoir un processus performant, les facteurs primordiaux sont le substrat cellulaire, le milieu de culture cellulaire et le système de production. Généralement, les cellules primaires de rein d'agneau ou de testicule d'agneau sont les plus couramment utilisées pour la prolifération des CaPVs et la production de vaccins [8]. Cependant, la préparation des cellules primaires est un processus lourd et compliqué conduisant à des lots irréguliers difficiles à standardiser. De plus, les cellules primaires peuvent transmettre des agents étrangers et causent une contamination du vaccin [9]. Plusieurs efforts ont été concentrés sur l'utilisation des lignées cellulaires dans la production virale des CaPVs comme les cellules MDBK et OA3.Ts ; mais, ces cellules donnent des titres relativement faibles par rapport aux cellules primaires, et leur pureté n'est pas claire ce qui limite leur exploitation. Les cellules Vero sont connues d'être les cellules les plus utilisées dans le domaine pharmaceutique pour la production des vaccins viraux, cependant un vaccin contre le virus LSD produit sur ces cellules a perdu son immunogénicité [10].

Le titre viral est lié de façon directe à la densité cellulaire, cette dernière dépend de l'environnement et du système de production. Les cellules sont fréquemment cultivées sur des systèmes conventionnels stationnaires (2D) tels que les bouteilles roulantes et Cell Factories. Mais, ces systèmes comprennent un fonctionnement compliqué, des opérations lourdes et fournissent de faibles densités cellulaires. Les microporteurs tels que Cytodex ont également été largement utilisés pour les cellules adhérentes, offrant un bon mélange et un bon transfert d'oxygène, mais elles entraînent aussi de faibles densités cellulaires en raison de l'accumulation de métabolites toxiques et de cisaillement élevé. Pour enlever la contrainte de cisaillement, d'autres réacteurs ont été développés tels que la fibre creuse (Hollow fiber), les bioréacteurs à lit fixe (Packed-bed) et les bioréacteurs Wave. En général, ces systèmes présentent les avantages d'un bon mélange, d'une aération et d'un bon apport en nutriments ; mais ils nécessitent un système d'oxygénation extérieur et des compétences de fonctionnement sophistiquées.

Le milieu de culture cellulaire fournit les nutriments et les facteurs nécessaires à la croissance cellulaire, ainsi qu'à la régulation du pH et de la pression osmotique de la culture. Le meilleur milieu dépend du type de cellules cultivées, du processus de fabrication et du produit fabriqué.

L'optimisation de milieu de culture est restée un élément important de la recherche, qui vise à améliorer la croissance cellulaire et le titre du produit. La composition du milieu de culture doit être adaptée à chaque type cellulaire et elle a été largement modifiée au cours des années. Au début, elle a été constituée par des produits d'origine naturelle ; mais par la suite les chercheurs se sont orientés vers l'utilisation de milieux synthétiques à base de produits chimiques qui ont le même effet que les produits naturels. Généralement le milieu de culture doit fournir les sels inorganiques, les acides aminés, les glucides les vitamines, de plus il peut contenir les facteurs de croissance, et des hormones.

Récemment, un grand intérêt s'est orienté vers l'utilisation des hormones des plantes dans la culture des cellules animales. Ces hormones végétales offrent un effet antioxydant contre le stress qui peut être produit par les métabolites excrétés au cours de la culture ce qui favorise la croissance cellulaire permettant d'avoir des densités importantes.

Le développement d'une lignée cellulaire permissive pour les CaPVs, l'optimisation du système de production et l'amélioration de la composition du milieu de culture sont tous les clés pour avoir une meilleure production d'antigène avec un titre très élevé. Mais, pour obtenir un vaccin efficace contre un virus il faut tester son efficacité et son effet sur le taux d'anticorps chez l'animal, ceci implique le choix d'un test le plus convenable donnant des résultats fiables et exploitables. Le control de reponse des vaccins CaPVs peut être réalisé par différents tests tel que le test de neutralisation du virus (VNT) [11], le test d'immunofluorescence indirecte (IFA) et ELISA et d'autres tests immunologiques tels que le test Western blot [12,13]. Cependant, ces différents tests ont montré une faible sensibilité. A ce jour, le VNT est le seul test sérologique validé par l'OMSA comme étant un test à haute spécificité pour la détection des anticorps spécifiques du Capripoxvirus [14]. Par ailleurs le virus Sheepox et Goatpox présentent un effet similaire sur les cellules ce qui rend très difficile de différencier les effets de ces deux virus.

L'ensemble des données montrent clairement que l'élaboration d'un vaccin en général et celui contre les CaPVs en particulier demande un effort de recherche et des dispositifs

exceptionnels dans toutes les étapes de la fabrication avant de réussir à proposer une solution vaccinale.

L'objectif général de cette thèse est une contribution à l'amélioration du processus de fabrication des vaccins CaPVs et ceci depuis l'étape de l'isolement du virus jusqu'à l'étude de l'efficacité du vaccin après vaccination. Pour ceci on se propose de :

- Evaluer et de développer des cellules ayant un bon rendement cellulaire et viral et qui peuvent être congelées jusqu'à leur utilisation,
- Evaluer ces cellules pour le control des virus Capripox.
- Tester et de remplacer le système conventionnel de production par un nouveau système de production,
- Augmenter la densité cellulaire par modification de la composition du milieu de culture et l'ajout des phytohormones connues pour leur effet sur la croissance et la division cellulaire,
- Introduire une nouvelle méthode de détermination de l'efficacité du vaccin CaPVs après vaccination.

Ainsi se résume l'essentiel du présent travail qui sera présenté en trois parties : La première partie correspond à une synthèse bibliographique consacrée, essentiellement, aux généralités sur les virus du genre Capripoxvirus, leur structure, leur épidémiologie, leur diagnostic, les vaccins employés pour contrôler ces virus et le processus de la production de ces vaccins. La seconde partie est la partie pratique du travail ; elle sera présentée sous forme d'articles (publiés ou soumis pour publication) avec une synthèse précédant chaque article et montrant clairement l'objectif de l'étude, la méthodologie ainsi que les résultats importants trouvés. Cette partie pratique est subdivisée en 3 chapitres ; le chapitre 1 est dédié au développement du substrat cellulaire pour l'isolement, la propagation et la production des Capripoxvirus. Le chapitre 2 s'intéressera à l'amélioration du processus de production de l'antigène des Capripoxvirus. Enfin le chapitre 3 traitera l'Evaluation de l'efficacité des vaccins des Capripoxvirus.

Une discussion générale de l'ensemble des résultats composera la troisième partie et une conclusion générale et des perspectives de recherche, pour la poursuite de ce travail, seront données pour clore cette thèse.

Revue Bibliographique

1. Généralités sur les Capripoxvirus

Les Capripoxvirus (CaPVs) représentent l'un des huit genres dans la sous-famille des chordopoxvirus (ChPVs) des *Poxviridae*. Le genre Capripoxvirus est actuellement composé de Sheeppoxvirus, Goatpoxvirus et Lumpy skin disease causant des maladies chez les ovins, les caprins et les bovins, respectivement [15]. Ces virus sont responsables de certaines maladies des ruminants domestiques en Afrique et en Asie [16]. Ces virus sont classés par l'OMSA en tant qu'agents pathogènes à déclaration obligatoire en raison de leur impact économique important. Les maladies causées par les CaPVs sont transfrontalières se propageant facilement entre pays ce qui constitue un obstacle important au commerce du bétail et affecte particulièrement le bien-être économique des agriculteurs [6].

La plupart des souches de CaPVs sont hautement spécifiques à l'hôte [17]. Ainsi, les isolats de SPPV causent des maladies principalement chez les moutons, et les isolats de GTPV causent des maladies principalement chez les chèvres [18]. Cependant, les deux espèces de petits ruminants peuvent contracter la maladie à partir d'une seule souche du virus [19]. Il existe deux types de virus de SPPV ; l'un affecte à la fois les ovins et les caprins tandis que l'autre est spécifique à l'hôte (mouton). Il est possible que la préférence d'hôte, manifestée par différentes souches, soit due à leur adaptation à la présence d'ovins ou de caprins seuls dans une zone géographique limitée [20].

Des études récentes indiquent que des souches de SPPV passent entre les moutons et les chèvres, mais ils provoquent une maladie plus grave chez les moutons ; alors que le GTPV était le seul responsable de toutes les épidémies chez les moutons et les chèvres [21]. De plus, certaines souches de virus infectant les moutons peuvent provoquer une maladie bénigne chez les caprins et une maladie grave chez les ovins alors que les souches caprines virulentes peuvent infecter les moutons [22]. Les CaPVs ont une réaction croisée au sein du genre Capripoxvirus [23]. L'infection croisée se produit également entre les souches de LSDV montrant des préférences d'hôtes, cependant aucune preuve n'a soutenu que le LSDV peut causer des maladies chez les petits ruminants [24] ; mais peut entrainer des maladies chez les ruminants sauvages ; il infecte ainsi le

springbok, l'impala et la girafe, les buffles africains et d'Asie, le gnou bleu, l'élan, et le grand koudou [23, 25,26].

Les chameaux ne sont normalement pas affectés par le LSD. Un seul cas clinique naturel de LSD a été trouvé [27]. Par ailleurs, aucune confirmation que le LSDV, le SPPV, et le GTPV peuvent affecter les humains [28].

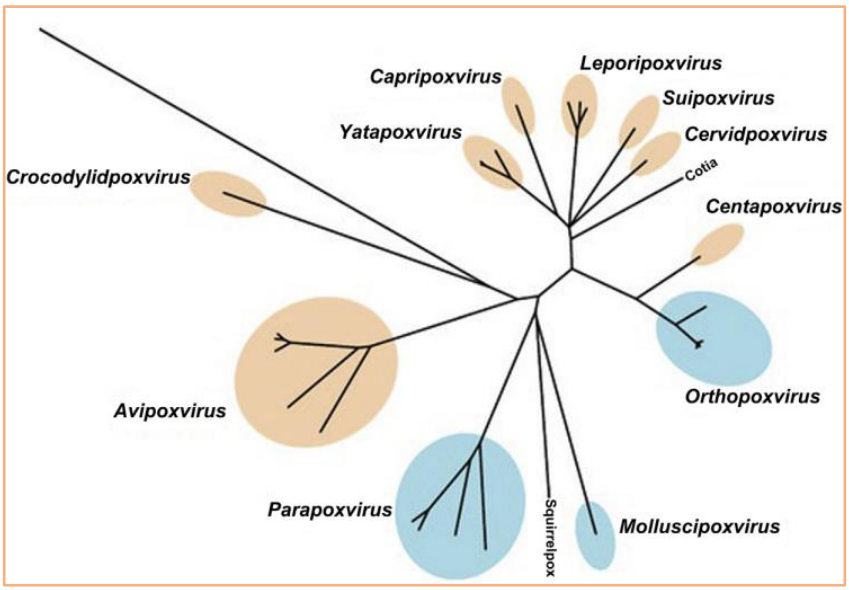


Figure 1 1Arbre phylogénétique des poxvirus [29].

2. Structure et Biologie des Capripoxvirus

Les Capripoxvirus ont une structure complexe, avec un génome à ADN double brin entouré d'une enveloppe virale et d'une capside protéique et ovales avec une taille approximative de 200 × 300 × 270 nm pour SPPV et GTPV. Les génomes SPPV et GTPV mesurent environ 150 kpb et sont similaires les uns aux autres, présentant une identité de nucléotides de 96 % [30]. Les génomes du SPPV et du GTPV sont très similaires au LSDV, partageant 97 % d'identité nucléotidique. Tous les gènes SPPV et GTPV sont présents dans le LSDV. Notamment neuf gènes de LSDV avec des fonctions de virulence et d'hôtes qui ne sont pas présents chez SPPV et GTPV [31,32].

Généralement Les virions de la famille *Poxviridae* sont quelque peu pléomorphes, en forme de brique avec une membrane de surface lipoprotéique présentant des unités tubulaires ou globulaires (10–40 nm). Ils peuvent aussi être ovoïdes (250–300nm de long x 160–190nm de diamètre) avec une membrane de surface possédant un filament spiralé régulier (10–20nm de diamètre) [33].

La membrane de surface renferme une région qui contient l'ADN et les protéines organisées en un complexe nucléoprotéique. Un modèle récent suggère que le complexe nucléoprotéique pourrait être cylindrique, plié au moins deux fois formant une structure en Z, qui se présente sous la forme de trois cercles, disposés linéairement lorsqu'il est vu comme une section à travers l'axe court. Cette forme de virion est connue sous le nom de virion mature (MV) ; certains MV sont enveloppés par une double couche supplémentaire des membranes intracellulaires (dérivées du trans-Golgi ou des endosomes) pour former des virions enveloppés (IEV) qui peuvent être extériorisés et perdent la plupart des couches membranaires supplémentaires, par fusion avec la membrane cellulaire, pour former des virions extracellulaires (EV). Les EV sont antigéniquement distincts des MV, en raison de la présence de protéines spécifiques à l'enveloppe [34, 35,36].

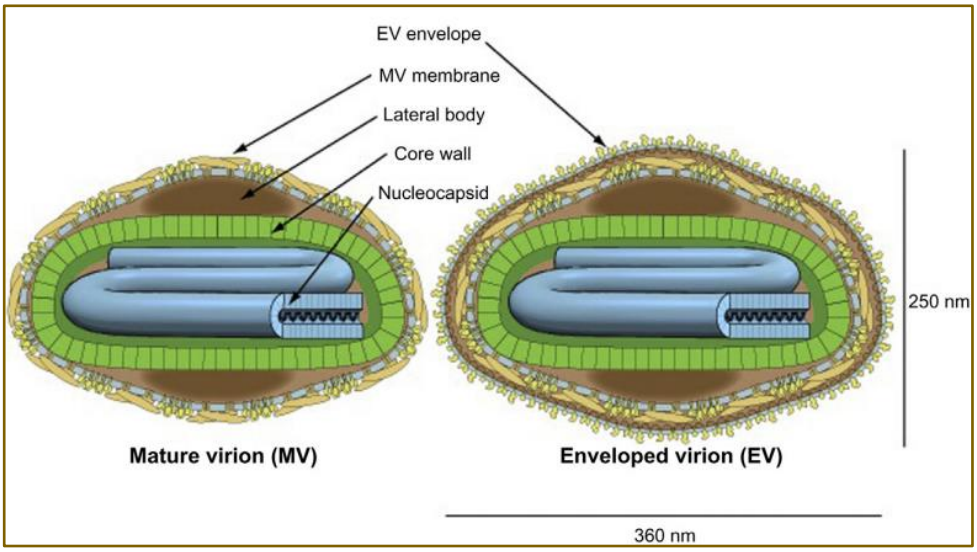


Figure 2 Structure génomique du Capripoxvirus : enveloppée, en forme de brique et 300 3 270 3 200 nm. La membrane superficielle présente des tubules superficiels ou des filaments superficiels. Il existe deux particules virales infectieuses distinctes : le virus mature intracellulaire et le virus enveloppé extracellulaire [37]

3. Pathogenèse et transmission des Capripoxvirus

3.1. Pathogenèse des CaPVs

Les Capripoxvirus peuvent causer une large gamme de maladies, allant de la variole aux infections cutanées bénignes chez les animaux domestiques et les animaux sauvages. La pathogenèse des poxvirus est complexe et varie en fonction de l'hôte et de la souche virale, mais peut impliquer la prolifération cellulaire, l'induction de l'apoptose, la formation des lésions cutanées et la suppression du système immunitaire de l'hôte.

Le LSDV cause des lésions dans la bouche, les narines, le pharynx, le larynx et la trachée. Ces lésions sont caractérisées par une érosion et une ulcération, susceptibles de servir de sources de virus dans la salive et les sécrétions nasales chez des animaux gravement infectés [38].

Le LSDV cause un taux de morbidité de 5 à 45% alors que le taux de mortalité reste généralement inférieur à 10 %, bien que les deux puissent être considérablement plus élevés. La morbidité peut arriver parfois jusqu'à 100 % [39]. Pour les SPPV et GTPV, ils peuvent entraîner une morbidité très élevée (70 à 90 %) et une mortalité jusqu'à 50% [40]. Les jeunes animaux sont plus sensibles ; la mortalité des agneaux et des chevreaux peut atteindre 100% [6]. En plus des espèces, le stress, les infections co-existantes, les races, l'âge, l'immunité de l'hôte et les isolats de virus peuvent tous influencer la morbidité et la mortalité par maladie [39,40]. Par ailleurs, le partage des sources d'eau et l'introduction de nouveaux animaux dans un troupeau augmentent également le risque d'épidémie des virus [41].

3.2. Transmission des Capripoxvirus

3.2.1. Transmission directe et indirecte des CaPVs

La transmission du LSDV par contact direct s'est avéré être une voie inefficace [42]. Carn et Kitching [43] ont confirmé qu'aucun des animaux en contact avec des porteurs de la maladie n'a développé de signes cliniques ou produit un niveau détectable d'anticorps neutralisants. Néanmoins, la dissémination du virus LSDV se produit malgré les tentatives de limiter l'épidémie en contrôlant le mouvement de bétail. Cette dissémination se fait par des vecteurs [44]. Le virus de la variole ovine et caprine est très contagieux. Les moutons et les chèvres infectés excrètent le virus dans les sécrétions orales, nasales et oculaires et la transmission se fait par les aérosols et le contact direct [45]. Cependant, le temps nécessaire pour que l'infection se manifeste chez les nouveaux moutons introduits sont de 20 à 40 jours [46]. Le mouvement des animaux contaminés est la principale cause de transmission de ces agents [47].

En raison de la stabilité du virus, le SPPV et le GTPV peuvent persister dans l'environnement pendant longues périodes ce qui entraîne l'infection des animaux [45].

Le virus LSDV est susceptible de persister dans les aérosols et les gouttelettes provenant des animaux infectés [46] ; la transmission indirecte du LSDV peut se produire lorsque les bovins partagent des mangeoires ou des abreuvoirs contaminés par la salive ou les sécrétions nasales d'animaux infectés [38].

D’autres types de transmission ont été signalés tels que la transmission intra-utérine de la mère au veau via du lait contaminé ou des lésions cutanées sur le pis et les trayons de la mère [42]. Le LSDV a été, également confirmé d'être présent dans le sperme et la transmission par le sperme de bovin contaminé a été démontrée expérimentalement par Annandale et *al*. [48]. Des essais d'inoculation intradermique du LSDV chez les bovins ont montré que les animaux restants ne présentaient qu'une maladie localisée. En revanche, la voie de l'inoculation du LSDV dans le sac conjonctival n’a pas donnée d'infection [43].

Carn et Kitching [43] ont suggéré que le cycle d'infection du LSDV nécessite une inoculation dans la circulation sanguine, qui est une voie typique chez les insectes se nourrissant de vaisseau sanguin. En effet, la maladie généralisée se produisait dans moins de 20 % des cas qui ont été inoculés par voie intradermique alors que la maladie est généralisée chez 70 % des animaux après une inoculation par voie intraveineuse.

3.2.2. Transmission par vecteurs (insectes et tiques)

Dès 1957, les moustiques étaient suspectés de jouer un rôle dans la transmission du LSD lorsqu'on a rapporté que les épidémies de LSD au Kenya étaient associées à une forte incidence des moustiques *Aedes natronius* et *Culex mirificus* [38]. De même, il a été démontré que *Aedes aegypti* est le seul diptère capable de transmettre le virus aux bovins sensibles [49]. D’autres insectes tels que *Stomoxys calcitrans* [42], *Culicoides. nubeculosus* [50]. *Culicoides punctatus* et *Biomyia fasciata* [51, 52], *Haematobia irritans* sont des transmetteurs potentiellement efficaces du LSDV [53]. *Stomoxys calcitrans* est également un insecte qui a transmis le virus Capripox aux moutons et aux chèvres [53].

La première épidémie de LSDV au Soudan a été associée à la présence de tiques du genre *Amblyomma* sur les animaux infectés [54]. Tuppurainen et *al*. [55] ont signalé le rôle des tiques ixodidés dans la transmission du LSDV. La transmission du LSDV par *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, la transmission mécanique par les mâles *Rhipicephalus appendiculatus* et *Amblyomma hebraeum*, ainsi que la transmission transstadiale par *Amblyomma hebraeum* ont été également signalées [53,55].

4. Historique et distribution géographique des Capripoxvirus

Goatpoxvirus (GTPV) et Sheeppox virus (SPPV) sont dérivés d'un ancêtre de type Lumpy skin disease (LSDV) qui s'est adapté aux moutons et/ou aux chèvres [87]. La dermatose nodulaire contagieuse (Neethling) des bovins (LSD), a été décrite pour la première fois en 1929 en Rhodésie du Nord (Zambie) [56]. Après de nombreuses tentatives pour isoler l'agent causal un poxvirus a finalement été isolé à partir de lésions cutanées bovines et identifié comme causant le vrai LSD chez les bovins. Le premier isolat a été obtenu en Afrique du Sud et connu sous le nom d'isolat de Neethling, ou LSDV Neethling [57,58].

De la Zambie, le LSDV s'est propagé vers le sud jusqu'au Botswana et Zimbabwe, et en 1944 la maladie est apparue en Afrique du sud où elle a provoqué une importante épizootie, touchant plus de 6 millions de bovins [59]. En 1957, le LSD a été diagnostiqué pour la première fois au Kenya à cause de l'introduction d'un troupeau de moutons atteint de la variole [60].

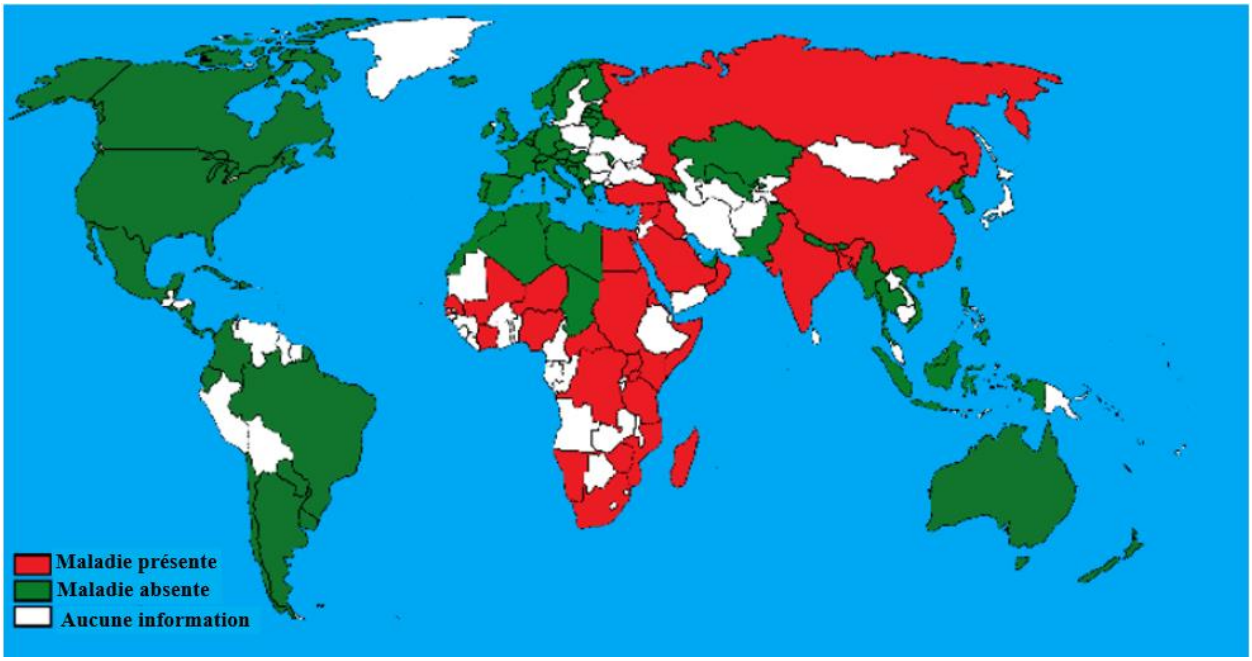


Figure3. Distribution géographique de LSDV en 2020 [65]

Le LSD s'est ensuite propagé progressivement dans presque tous les pays subsahariens à la fin des années 1970 [61]. Il a été également identifié en Égypte en 1988 provoquant une épidémie majeure [62]. Cependant, le LSDV reste encore une maladie limitée principalement au continent africain et asiatique, à l'exception de cas signalés à Madagascar en 1929 et chez l'oryx d'Arabie en Arabie Saoudite [63]. Des épidémies de LSDV ont été également signalées dans la

région du Moyen-Orient depuis 1990. Selon l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA), la LSDV a été trouvée au Koweït (1991), au Liban (1993), au Yémen (1995), aux Émirats arabes unis (2000), au Bahreïn (2003), et Oman (2010) [6].

Depuis l'année 2016 et 2022 l'épidémie de LSDV a été détectée en Arabie saoudite et a continué de se propager touchant Bulgarie, la République yougoslave de Macédoine, Serbie, Kosovo, Albanie, Monténégro, Turkménistan, Afghanistan, Pakistan, Chine, Bangladesh, arrivant au district de Ganjam à Odisha, en Inde, Thaïlande, arrivant Indonésie, mettant la biosécurité en état d'alerte élevée [66].

Historiquement, la distribution mondiale du SPPV et du GTPV a été plus large que le LSDV. Lefèvre (1983) a rapporté que la clavelée ovine a été observée au cours du premier siècle après J.C. En 1902, Borrel a pu identifier l'agent causal qui a été cultivé par la suite *in-vitro* en 1933 par Bidre [67,68].

Concernant la variole caprine, il n'y a pas d'indices qu'elle ait fait apparition en même temps que la clavelée ovine, cependant, plusieurs cas ont été rapportés en 1884 en Espagne et en Afrique du Nord, puis en 1898 en Italie [4].

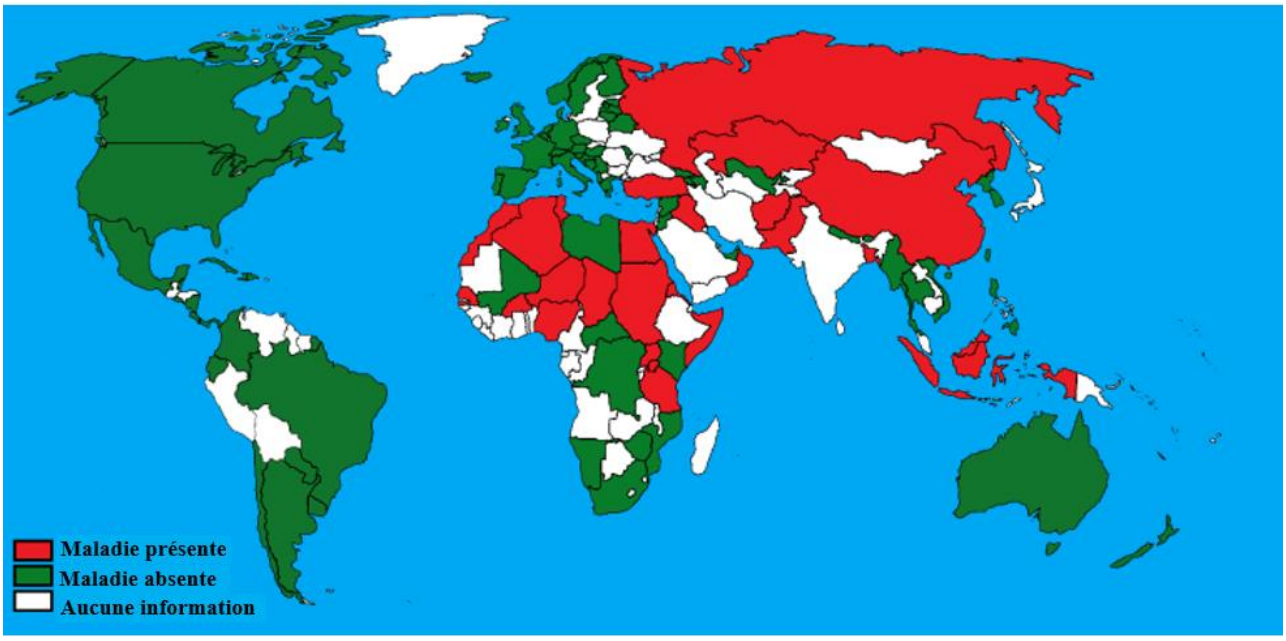


Figure 4. Distribution géographique de SPPV et GTPV en 2020 [65].

Capripox des moutons et des chèvres causées par Sheepox virus et Goatpox virus ou la variole est une maladie enzootique en Afrique au nord de l'équateur, au Moyen-Orient, Inde vers l'année 1936 et en Turquie à la fin de l'année 1970 et en Iran, Afghanistan Pakistan, Népal et certaines parties de la Chine, en Bangladesh et Soudan. La variole a été éradiquée de GrandeBretagne en 1866 et de France, Espagne et Portugal en 1967, 1968 et 1969 respectivement, en abattant les animaux infectés et en appliquant des mesures strictes de contrôle des déplacements.

Des épidémies sporadiques se produisent en Italie en 1983, en Grèce et en Bulgarie en 1995 et 1996 [6,69].

Depuis l'année 2005 la variole caprine a été signalée au Vietnam, en Égypte, l'Éthiopie, et Taipei chinois. En 2010 la maladie a été confirmée dans la région orientale du Maroc. Par contre le GTPV n'a jamais été signalé au Maroc, en Algérie ou en Tunisie malgré l'énorme population de chèvres vivant à proximité des ovins dans ces pays. Des épidémies sporadiques de SPP et de GTP ont été signalées en 2013 à Bulgarie et en Grèce, et la Russie et la Mongolie en 2015. La plus récente épidémie de clavelée s'est déclarée 2017 sur une race locale de moutons à Kafr Shalshamoun, Menya Al Qamh, Sharkia, et l'Égypte [17, 65, 66,70].

5. Impact économique

LSDV, SPPV et GTPV sont classés par l'OMSA comme étant des maladies à déclaration obligatoire en raison de leur potentiel de propagation rapide et de leur impact économique substantiel [71]. Les bovins sont particulièrement sensibles à LSD pendant le pic de lactation, ce qui affecte la production de lait à cause d'une forte fièvre prolongée. Des avortements et une stérilité temporaire ou permanente surviennent parmi les animaux infectés [72]. L'émaciation et une longue période de convalescence peuvent réduire considérablement le taux de croissance chez les bovins de boucherie [74]. De plus, les lésions de variole profonde dans la peau laissent des cicatrices permanentes, diminuant la valeur des peaux destinées à l'industrie du cuir [75].

Au Moyen-Orient, par exemple, dans les unités d'élevage intensif de bovins laitiers, les pertes totales de production directe causées par le LSD ont été estimées entre 45 et 65 % [76]. Pour SPP et GTP, les pertes directes d'animaux et la diminution de la productivité des animaux survivants entraînent des pertes annuelles moyennes de revenu de 30 à 43 % et les troupeaux

peuvent mettre jusqu'à 6 ans pour se remettre d'une épidémie [77]. De plus, le taux de mortalité du SPP et du GTP peut parfois être considérablement élevé, en particulier chez les agneaux et les chevreaux, ce qui cause des pertes financières importantes due aux restrictions au commerce international d'animaux, et des campagnes de vaccination coûteuses [78].

6. Technique de contrôle des Capripoxvirus

L'aspect clinique des lésions cutanées fait suspecter des CaPVs. Cependant, des analyses de laboratoire sont nécessaires pour un contrôle définitif. Il existe donc un besoin constant d'outils de contrôle adéquats. Les tests sont utiles pour la surveillance et le suivi à différents stades d'une épidémie [79]. Différentes caractéristiques de performances de contrôle sont requises en fonction de la situation et de l'objectif du test. Le besoin d'une spécificité/sensibilité élevée et de la capacité de différencier les souches virales de terrain des souches vaccinales conduit au développement de nouveaux et meilleurs tests [80].

6.1. Contrôle cellulaire : Isolement viral sur culture cellulaire

La culture cellulaire pour l'isolement viral est une lourde procédure, de plus certaines souches de terrain s'adaptent mal à la culture et nécessite deux ou trois passages à l'aveugle. La contamination bactérienne et fongique est fréquemment rencontrée avec les échantillons de biopsie, en particulier dans les cultures qui nécessitent une incubation prolongée [81].

6.1.1. Culture cellulaire primaire

Les virus Capripox sont capables de se multiplier sur plusieurs types de cellules d'origine bovine, ovine ou caprine, mais l'utilisation de cellules primaires de testicule d'agneau (LT) ou de rein d'agneau (LK) est recommandée par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) [82]. La présence du virus se traduit par l'effet cytopathique (ECP) qui peut commencer dès 2 jours après l'infection [83]. Cependant, si aucun ECP n'est observé après 7 à 14 jours, des passages supplémentaires sont recommandés pour confirmer la négativité. Le nombre de passages à effectuer n'est pas déterminé ni standardisé et présente une lacune dans les connaissances. Selon certains auteurs ce nombre varie de 1 à 8 [84].

Comme l’effet cytopathique (ECP) est non spécifique et peut être causé par de nombreux agents pathogènes, des tests de confirmation, tels que la neutralisation du virus et

l'immunofluorescence, peuvent être bénéfiques pour confirmer le statut Capripox, lorsque plusieurs passages ont été effectués [85].

6.1.2. Lignées cellulaires

Salnikov et *al.* [84] ont confirmé que les lignées cellulaires peuvent être utilisées pour la détection et l'adaptation des CaPVs, mais elles présentent un certain nombre d'inconvénients tels que la disponibilité d'un stock frais, des différences de fond génétique entre les lots et l'hétérogénéité des types de cellules.

La lignée cellulaire Vero a été un objectif poursuivi par plusieurs auteurs pour la réplication de CaPVs. Elles ont été utilisées pour la croissance d'isolats de GTPV [86], la multiplication de GTPV [87], la propagation de SPPV [87] et pour l'isolement du virus LSDV [88].

La lignée cellulaire de testicule ovin (OA3.Ts) a été également utilisée par Babiuk et *al*. [7] ; ces cellules présentaient un avantage supplémentaire qui est celui de la possibilité d'immunocoloration pour la vérification de CaPVs, mais un statut de pestivirus qui n'est pas clair. D'autres études ont évalué l'utilisation de cellules MDBK pour la réplication du LSDV, et la détection du virus SPPV [89,90]; mais le statut de cette lignée cellulaire n'est pas confirmé indemne de BVDV (bovine viral diarrhea virus) [91]. Des cellules continuent comme Adult Vervet Monkey Kidney (AVK 58) et Baby Hamster Kidney (BHK21) ont été utilisées pour la réplication du SPPV [92], cependant, il n'existe pas de données concernant leur sensibilité par rapport aux cellules LT ou LK, ce qui les rend moins adaptées au contrôle. Enfin, même si le LSDV peut se développer chez certaines espèces de tiques il n'a pas pu être cultivé sur les lignées cellulaires de tiques [93].

6.1.3. Membrane chorio-allantoique

En plus des lignées cellulaires, les virus Capripox peuvent également être isolés dans les œufs de poule embryonnés (ECE). Des lésions caractéristiques de type pox peuvent être observées sur la membrane chorio-allantoïque (CAM) qui semble être le site de prédilection du virus. La propagation du SPV dans les œufs de poule embryonnés n'est pas concluante [94]. Des inclusions cytoplasmiques, ainsi que des cellules inflammatoires et une nécrose dans la membrane chorioallantoïque infectée (CAM) ont été observées.

La présence de LSDV sur la CAM a pu être confirmée par PCR après 1 jour d'infection et au 2ème jour en utilisant les techniques immunoenzymatiques [94]. Le pic de la multiplication virale est obtenu avec des lésions embryonnaires âgées de 5 à 7 jours mais les lésions caractéristiques du pox sur la CAM sont plus susceptibles d'être observées lors de l'utilisation des embryons âgés de 7 à 11 jours [95, 96].

6.2. Détection et identification des virus par les tests sérologiques

La détection et l'identification des virus font appel à différentes méthodes. Ces méthodes se caractérisent par leur spécificité et leur sensibilité. Outre la détection biologique qui se fonde sur les propriétés symptomatologiques, on peut citer la détection sérologique qui cible la protéine de la capside par un anticorps et la détection moléculaire qui cible l'acide nucléique viral

6.2.1. Détection directe du virus

a) ELISA d'Antigène

Les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA), basées sur la capture d'antigène ou d'anticorps, ont été étudiées et évaluées en 1976. L'importance de ces techniques réside dans leur utilisation dans de nombreux domaines [97].

La première ELISA pour la détection des antigènes CaPVs a été décrite par Sharma et *al*. [98] Leur méthode a été fondée sur le coating des plaques par des sérums hyperimmun (HIS) de virus GPV mais elle présente l'inconvénient de fort arrière-plan. En 1995, un autre test ELISA d'antigène a été développée par Carne et al [99] pour la détection de l'antigène du CaPVs dans le surnageant de culture tissulaire et le matériel de biopsie, il a été basé sur un antisérum détecteur polyclonal de cobaye, dirigé contre un antigène recombinant spécifique du CaPVs (protéine recombinante P32), exprimé dans *Escherichia coli* en utilisant le vecteur plasmidique pCiEX-2T. Cette protéine est localisée dans l'enveloppe du virus ; elle représente l'une des principales protéines structurelles du virus [100]. Le sérum monospécifique préparé contre cette protéine d'enveloppe a neutralisé le virus indiquant que cette protéine contient des épitopes neutralisants, induisant des réponses immunitaires à médiation cellulaire. Ensuite Ngichabe et *al*. [101] ont démontré que L'ELISA d'antigène basée sur la protéine P32 présente une spécificité élevée mais une sensibilité faible. Rao et *al* [102] ont trouvé le même résultat en utilisant un test immuno-enzymatique d'immunocapture (IC-ELISA) pour la détection de l'antigène du Goatpoxvirus dans des échantillons de biopsie cutanée obtenus à partir de chèvres infectées.

Une ELISA indirecte a été optimisée et évaluée à l'aide d'un antigène purifié du virus GPV, atténué donnant une sensibilité de 90% et 94.26% de spécificité [103]. Même spécificité a été donnée par une ELISA indirecte basée sur le Sheepox virus inactivé [104].

Récemment, après la propagation du LSD en Europe et en Asie, un test ELISA a été développé, commercialisé et largement utilisé sur le terrain pour le contrôle ou pour évaluer la protection conférée. Des études ont prouvé que le Kit ELISA multi-espèces ID Screen® Capripox double antigène d'ID vet® (Montpellier, France) a eu une utilisation positive pour la détection d'anticorps contre la dermatose nodulaire contagieuse (LSD) [105].

La dernière innovation dans ce domaine a été réalisée en 2021, par Ebrahimi-Jam et *al*. qui ont développé et évalué une ELISA pour les CaPVs. Leurs résultats ont indiqué que le système ELISA basé sur la protéine Tr. P32 pourrait potentiellement être utilisé dans la sérosurveillance de tous les CaPVs ; toutefois, d'autres investigations sont nécessaires [106].

b) Test d'Agar gel precipitation (AGPT)

Cette méthode a été décrite pour la détection des CaPVs pour la première fois par Kitching et en 1986 [107]. Toutefois, cette technique est très peu abordée car elle ne différencie pas entre les CaPVs à cause de la protection croisée et de la faible sensibilité [108,109]. Le test de contre-immunoélectrophorèse (CIE) est avéré plus sensible que le test de précipitation sur gel d'agar [110] pour la détection sérologique de Goatpox, le contrôle rapide de Sheepox [111] et la détection de l'antigène d'un autre type de poxvirus (vaccinia) dans les lésions cutanées du veau, du lapin et de l'homme ainsi que dans les CAM infectés [112].

6.2.2 Détection indirecte du virus

a) Virus Neutralisation test (VNT)

La réponse immunitaire contre les CaPVs est principalement à médiation cellulaire, mais l'immunité humorale joue également un rôle [113], de sorte que le titrage des anticorps sériques peut refléter le niveau de protection de l'animal individuel. Sur cette base, le test de neutralisation du virus (VNT) est considéré comme référence et le seul test sérologique validé qui a été utilisé pour évaluer le statut immunitaire chez des animaux individuels ou dans des populations post-vaccinées [82]. VNT est le meilleur test pour le contrôle sérologique parce que les CaPVs ont une protéine similaire P32 qui rend difficile la distinction entre LSDV, SPPV et GTPV et cause une protection croisée [114,115]. Selon la constante, il existe deux méthodes de VNT, méthode Beta

sérum (variable/virus constant) et méthode Alpha (sérum constant/virus variable). Dans la première méthode, un sérum est titré par rapport à un titre constant d'une souche CaPVs. Comme le sérum a des propriétés de blocage inhérentes, un seuil de dilution doit être défini à partir duquel un échantillon de test doit être considéré comme positif [116]. La deuxième méthode consiste à titrer une souche virale par rapport à une concentration constante du sérum. Un indice de neutralisation (NI) peut être calculé comme la différence logarithmique du titre du sérum à tester et d'un sérum témoin négatif [82]. La technique VNT a une forte spécificité pouvant atteindre 100 % mais une sensibilité de 70 % et 96 % pour les CaPVs [105].

b) ELISA de Détection des Onticorps

La détection des anticorps des Capripox virus peut être réalisée aussi par des ELISA anticorps home-made. Le premier type d'ELISA utilise le virus complet comme antigène de coating. Une autre ELISA de même principe a été mise au point par Bhanuprakash et *al*. En 2006 ; ils ont utilisé le vaccin de GTPV dans l'étape coating. L'évaluation de cette technique a révélé qu'elle présente une sensibilité de 87% et spécificité de 89% [117]. Une étude en 2009 a étudié l'efficacité d'une ELISA basée sur le SPPV Nigérian inactivé pour la détection des anticorps des sérums caprins et ovins. Ils ont trouvé que ce test présente une sensibilité et une spécificité de 96 et 95 % respectivement en comparant avec VNT [53], toutefois la sensibilité était plus faible avec des sérums LSDV (88 %) mais avec la même spécificité.

La deuxième ELISA est indirecte et basée sur la protéine recombinante P32, exprimée par des systèmes procaryotique (*Escherichia coli*) [157] ou bien eucaryotique (*Pichia pastoris*) ; Bhanot et *al*. Ont utilisé cette dernière pour produire une ELISA pour la détection des anticorps ; ils ont conclu que la méthode a une spécificité et sensibilité de 84 et 94/100% respectivement en utilisant des sérums de SPPV [118]. Les mêmes résultats ont été obtenus par Carn et *al*. en 1995 utilisant des sérums LSDV [80].

D'autres protéines ont été essayées pour la détection des CaPVs ; Bowden et *al*. [119] ont utilisé deux protéines de virion (SPPV ORF95 et 103) comme agents coating. Comme les ELISA antigène, IDVET a fabriqué et commercialisé une ELISA kit commercial double antigene (ID Screen® Capripox Double Antigen Multispecies), ce test a été prouvé spécifique (99,7%) et plus sensible que le VNT.

c) Test d'Immunofluorescence

Le test d'immunofluorescence a été exploité pour la première fois en 1971 par Davies et *al*. Pour le contrôle de LSDV [120]. Ce test a été appliqué pour détecter et localiser l'antigène des CaPVs [121], pour fournir un contrôle rapide de la variole et la dermatose contagieuse, et pour le statut immunitaire de l'animal [122] donnant une sensibilité et spécificité de 92 et 94 % respectivement contre 86 et 96 % pour le VNT. En revanche la FAT indirecte est plus sensible que le test direct en raison de la disponibilité de sites de liaison supplémentaires. La FAT indirecte a été largement connue d'être l'une des techniques les plus importantes dans les études des virus; mais le coût des réactifs et le temps associé à son exécution par rapport à ELISA rend son application dans les dépistages à grande échelle

d) Western Blot

Cette méthode fournit une sensibilité et une spécificité pour la détection d'anticorps dirigés contre les protéines structurales du virus Capripox. Western Blot est plus spécifique que l'AGTP (Test agar précipitation) car cette dernière présente le problème de réactions croisées au sein du genre Capripox [164]. Toutefois, Western blot demande beaucoup de travail et n'est pas toujours facile à interpréter. Elle est moins adaptée à un débit élevé [166].

e) Techniques d'immunocoloration: immunoperoxidase assay (IPMA)

Un antisérum Capripox conjugué à la peroxydase (IPMA) peut également être utilisé pour détecter la présence du virus directement dans plusieurs tissus. Le test immunoperoxidase a été exploité pour la détection de différents types des virus comme le fowl pox et le virus de la rage [123, 124]. Cette méthode a été utilisée pour d'autres virus tels que le virus vaccinia, le virus de la peste porcine africaine, le circovirus porcin de type 2, le virus influenza porcin [125, 126, 127,128]. Récemment en 2020 Haegman et *al*. [55] ont développé une IPMA pour la détection des anticorps anti-LSDV et anti-SPPV et ils ont conclu qu'en comparaison avec VNT et ELISA commerciale, IPMA a pu détecter les anticorps du virus plus tôt chez les animaux infectés et vaccinés. Le test est très flexible car il peut être facilement adapté pour la détection des anticorps de la clavelée ou de la variole caprine et il peut être mis à grande l'échelle. Le test a d'autres avantages comme la simplicité d'exécution, la sensibilité et la spécificité.

6.3 Détection et identification des virus par les tests moléculaires

a) Polymerase chain reaction (PCR)

La détection du génome viral par PCR est une méthode indirecte de la présence du virus vivant. La confirmation rapide en laboratoire du virus Capripox basée sur les signes cliniques, utilisant les tests sérologiques susmentionnés n'est pas toujours fiable. Même l'isolement du virus dans la culture cellulaire et l'ELISA ne parviennent pas à détecter les particules virales liées à l'anticorps neutralisant [79]. En 1998 Ireland et *al*. [130] ont amélioré la détection des CaPVs dans les échantillons des biopsies utilisant des amorces qui ont été ultérieurement décrites dans une PCR gel based Pan par le manuel OMSA pour le contrôle des CaPVs. En 2005 cette PCR a détecté le LSDV, après une infection expérimentale, dès 2 dpi dans le sang et aussi après 28 dpi. Le génome viral pouvait encore être détecté dans les biopsies cutanées à 92 dpi [131]. Une autre PCR pour la détection des CaPVs a été décrite par Mangana-Vougiouka en 1999, mais elle a été utilisée seulement pour le virus Sheeppox [132]. Markoulatos et *al*. [133] ont combiné les deux PCRs developpées par Ireland et Mangana afin de maximiser la spécificité et la sensibilité. D'autres PCR panCapx ont été mis au point montrant une haute sensitivité et spécificité [134]. La technique PCR est plus rentable pour le contrôle de SPPV et GTPV à partir d'isolats terrain lorsqu'elle est combinée par l'enzyme de restriction de PCR-amplicons [135] ce qui produit un autre type de PCR associé au RFLP et permet de distinguer entre les espèces de CaPVs.

Le gène P32 a été utilisé pour plusieurs tests PCR-RFLP pour faire la distinction entre SPPV et LSDV en utilisant soit par l'enzyme de restriction EcoRV ou entre SPPV et GTPV en utilisant HindI [136]. Une autre approche est utilisée par Lamien et *al*. [137] permettant la différenciation sans utilisation des enzymes de restriction. En 2014 Venkatesan et *al.* ont ajouté la possibilité de différencier entre GTPV et SPPV au cours de contrôle avec une spécificité de 90-91% et une sensitivité de 97 -98% [138].

La PCR en temps réelle a été créé pour la première fois pour les virus CaPVs par Balinsky et *al.* [139] permettant de contrôler l'amplification virale en temps réel. Cette méthode a été confirmée d'être 100 fois plus efficace que la méthode conventionnelle. Bowden et *al*. [235] ont montré que cette PCR est hautement sensitive permettant de détecter le virus SPPV et GTPV dans le sang total dès 4 et 6 jours après infection. Plusieurs études ont démontré que ce test PCR est

bénéfique dans la différenciation entre les virus Capripox et aussi entre la souche virulente terrain et vaccinale en visant une délation au niveau d'enveloppe virale [140].

La spécificité, sensibilité et la rapidité de détection sont tous des avantages qui ont poussé les industries à la mise au point de différents kits de PCR en temps réel Pan Capx sur le marché telles que Techne qPCR et Genesig advance kit (tous deux ciblant le gène LSDV116), et Le PanCapx (ID Gene® Capripox Virus Triplex) [79].

b) Amplification isotherme médiée par la boucle (LAMP)

Une dérivée de PCR classique a été développée par Notomi et *al.* [141] : LAMP. Il s'agit d'une méthode d'amplification d'acide nucléique qui est catalysée par une ADN polymérase avec une activité de déplacement de brin et se produit dans des conditions isothermes à des températures comprises entre 60 et 65°C. Le produit d'amplification peut ensuite être visualisé par différents moyens tels que la turbidité, la fluorescence, les gels d'agarose, le changement de couleur à l'aide d'un indicateur de liaison aux ions métalliques tel que le bleu d'hydroxynaphtol (HNB) [142].

LAMP a été démontrée efficace pour détecter la différenciation entre les SPPV et GTPV [139].

c) Amplification par recombinase polymérase (RPA)

L'amplification par recombinase polymérase (RPA) est une autre technique d'amplification isotherme très sensible et sélective, fonctionnant à 37–42 °C, avec une préparation minimale de l'échantillon et capable d'amplifier 1 à 10 copies cibles d'ADN en moins de 20 min [143]. Le LSDV RPA a été proposée par Shalaby et *al*. [144] utilisant une sonde modifiée pour une détection en temps réel, avec une spécificité et une sensibilité de 100 %. RPA a été 100% spécifique et 97% sensible pour SPPV et GTPV [145].

d) Autres méthodes moléculaires

En plus de la PCR, d'autres méthodologies peuvent être appliquées telles que la détection directe d'acides nucléiques à l'aide de sondes marquées. Dans une étude d'Awad et *al* [146] l'hybridation dot blot (DBH) a été utilisée et comparée à la PCR décrite par l'OMSA pour le contrôle du LSDV à partir des biopsies cutanées de bovins cliniquement infectés. Les résultats ont montré une corrélation de 100 % entre le DBH et la PCR mais cette méthode s'est montrée moins sensible que la PCR quand le test est utilisé pour le contrôle des échantillons de sang.

6.4 Autres tests de détection et identification des CaPVs

Quelques autres tests ont été développés pour le contrôle de la variole ovine/caprine mais ils sont moins utilisés à l'échelle mondiale. Il s'agit du test d'agglutination au latex [103], du test d'hémagglutination passive en phase inverse (RPHA), du Spot agglutination et du test d'hémolyse radiale (SRH), et Immunodiffusion radiale (SRID) [147].

Le contrôle des pox virus basé sur la détection des modifications histopathologiques et présence de l'antigène viral à l'aide de techniques immunohistochimiques dans les tissus infectés et l'observation des particules virales par microscopie électronique a été largement utilisé dans les années précédentes. Il a été exploité pour la première fois pour le contrôle du virus SPPV dans les tissus d'agneau naturellement infecté en 2000 par Gulbahar et *al.* [148].

7. Eradication et contrôle des Capripoxvirus

Le contrôle et l'éradication du SPPV et du GTPV repose principalement sur la détection précoce du cas suspecté, la rapidité de l'abattage de tous les animaux infectés et en contact, le contrôle strict des déplacements, la mise en quarantaine et la désinfection. Dans les zones où la maladie est nouvellement introduite, la détection précoce nécessite une sensibilisation à la maladie, ainsi que la capacité de contrôle des laboratoires locaux. Les moutons infectés doivent être isolés et placés dans un hangar entretenu de manière hygiénique. Un traitement palliatif est indiqué en complément d'une alimentation équilibrée. Les moutons affaiblis doivent recevoir une solution saline de glucose à 10 % par voie intraveineuse [149].

Les vecteurs de maladies peuvent se déplacer sur de longues distances avec les tempêtes de vent c'est ainsi que les stratégies de lutte antivectorielle telles que l'utilisation d'insecticides dans les pièges à vecteurs doivent être adoptées dans les zones à forte population de vecteurs pour contrôler la propagation de la maladie [150].

La prévention contre le LSDV est plus difficile par rapport aux autres CaPVs, par conséquent tout retard dans l'abattage sanitaire des animaux infectés laisserait le temps aux vecteurs de propager et de transmettre la maladie. Néanmoins, l'abattage sanitaire n'est pas toujours efficace à cause de la présence des animaux asymptomatiques, pour cette raison il doit être combiné avec d'autres mesures de contrôle [149]. Par ailleurs, aucun traitement spécifique n'est disponible pour une maladie virale, mais des antibiotiques sont administrés pour une infection bactérienne secondaire [151].

La vaccination est le moyen le plus efficace de contrôler la propagation des CaPVs, actuellement les vaccins les plus utilisés pour l'éradication sont des vaccins à base des CaPVs vivants atténués, mais des vaccins inactivés existent aussi.

7.1 Vaccins contre le virus Lumpy Skin Disease

Pour le lutter contre le virus LSD il existe des vaccins vivants atténués homologues à base des souches de LSDV qui assurent une protection efficace contre les souches virulentes et hétérologues à base de SPPV et GTPV (Tableau 1). Les vaccins homologues contiennent la souche LSD Neethling ou bien les souches KSGP O-240 et O-180. La souche Neethling a été isolée dans les premières épidémies de LSD en Afrique du Sud, elle a été atténuée après 61 passages sur les cellules de rein d'agneau (LK), suivis de 20 passages dans la membrane chorio-allantoique d'œufs embryonnés et finalement après trois passages dans les cellules LK. L'efficacité sur le terrain de ce vaccin a été démontrée entre 2016 et 2017 [152].

Les souches KSGP O-240 et O-180 sont les deux souches d'origine ovine, isolées au cours de la même épidémie mais à des moments différents [153]. Le niveau d'atténuation de ces souches est considérablement moins que la souche Neethling, les passages sont au nombre de 5 à 30. L'identification moléculaire de ces souches a révélé que ce sont des souches LSDV. Les vaccins issus de ces souches ont été testés pour l'innocuité sur les caprines et les ovines, alors que, le niveau d'atténuation était insuffisant pour les bovins, provoquant des signes cliniques post-vaccinaux [154].

Les autres types de vaccins sont soit basés sur le GTPV ou bien sur le SPPV [155,156]. Les effets secondaires de ces vaccins sont rarement détectés par rapport à ceux provoqués par les vaccins LSD atténués. Pour le GTPV, la souche atténuée G2-LKW a fourni une protection complète aux veaux expérimentaux avec un indice de protection moyen de 5,9 [156]. La deuxième souche, GTPV Gorgan, a fourni une meilleure protection et une séroconversion chez les bovins contre la souche virulente de terrain de LSD [157].

Les vaccins inactivés présent plusieurs avantages comme la sécurité ; leurs caractéristiques non réplicatives empêchant la transmission du virus vaccinal aux animaux naïfs, le retour à la virulence et la recombinaison avec des souches virales virulentes [158].

Un vaccin à base de la souche inactivée de Neethling a été évalué par Hamdi et *al*. [158] et Wolff et *al*. [159] qui ont rapporté que ces vaccins assurent une courte durée de protection et une faible immunogénicité après la vaccination.

Manufacturer	Product Name and Virus Strain	Target Species	Titre, Dose, Administration	Presentation Doses/Vial
Onderstepoort Biological Products (OBP) South Africa Email: info@obpvaccines.co.za http://www.obpvaccines.co.za (accessed on 22 September 2021)	Lumpy Skin Disease Vaccine for Cattle (LSD Neethling strain)	Cattle	Not known 2 ml SC	25/50
Intervet (Pty) South Africa/MSD Animal Health http://www.msd-animal-health.co.za (accessed on 29 September 2021)	Lumpyvax™ (LSD SIS Neethling type strain)	Cattle	$10^{4.0}TCID_{50}$/dose 1 ml SC	20/100
MCI Santé Animale Morocco Email: contact@mci-santeanimale.com http://www.mci-santeanimale.com/en/ (accessed on 29 September 2021)	Bovivax-LSD™ (LSD Neethling strain)	Cattle	$10^{3.5}TCID_{50}$/dose 2 ml SC	25/50/100
Jordan Bio-Industries Center (JOVAC) Jordan Email: sales@jovaccenter.com http://www.jovaccenter.com (accessed on 29 September 2021)	LumpyShield-N™ (LSD Neethling strain)	Cattle	$10^{4.0}TCID_{50}$/dose 1 ml SC	5/10/25/50/100
Middle East for Vaccines (MEVAC) Egypt Email: marketing@me_vac.com https://www.me-vac.com/about (accessed on 29 September 2021)	MEVAC LSD (LSD Neethling strain)	Cattle	$10^{3.5}TCID_{50}$/dose 1 ml SC	10/25/50
National Veterinary Institute (NVI) Ethiopia Email: nvi-rt@ethionet.et	Lumpy Skin Disease Vaccine (LSD Neethling strain)	Cattle	$10^{3.0}TCID_{50}$/dose 1 ml SC	5/20/100
Kenya Veterinary Vaccines Production Institute (KEVEVAPI) http://www.kevevapi.org/ (accessed on 29 September 2021)	Lumpivax™ (Live attenuated LSDV)	Cattle	$TCID_{50}$ not known 2 ml SC	50/100/150
Pendik Veterinary Control Institute/ Ministry of Agriculture, Turkey	Penpox-M™ Live SPPV (Bakirköy SPPV strain)	Cattle	$10^{2.5}TCID_{50}$/dose 3 ml SC	
Vetal Company Turkey Email: vetal@vetal.com.tr http://www.vetal.com.tr (accessed on 29 September 2021)	Poxvac™ (Bakirköy SPPV strain) Lumpyvac™ (LSD Neethling strain)	Sheep Cattle Cattle	$10^{2.5}TCID_{50}$/dose 3ml SC $10^{3.5}TCID_{50}$/dose 2 ml SC	20/50/100/200 10/25/50/100
Dollvet Turkey Email: dollvet@dollvet.com.tr http://www.dollvet.com.tr (accessed on 29 September 2021)	Poxdoll™ (Bakirköy SPPV strain) LSD-NDOLL (LSD Neethling strain)	Cattle Sheep Goats Cattle	$10^{2.5}TCID_{50}$/dose 3ml SC $10^{3.5}TCID_{50}$/dose 3ml SC	50/100 10/25/50/100
FGBI-Federal Centre for Animal Health, The Russian Federation Email: mail@arriah.ru http://www.arriah.ru (accessed on 29 September 2021)	Sheep Pox Cultyral Dry™(Arriah SPPV strain)	Sheep Cattle	Not known	50/100

Tableau 1. Vaccins commercialisés contre les Capripoxvirus

7.2 Vaccins contre les virus Sheeppox et Goatpox

Comme le LSDV, les vaccins contre SPPV et GTPV sont principalement vivants atténués, offrant une meilleure protection pendant 12 à 23 mois et une innocuité satisfaisante [160].

Pour le SPPV, un nombre important de souches a été documenté dans la littérature, et elles ont été atténuées après un nombre variable de passages sur différent type de cellules (Tableau 2).

En revanche les souches utilisées pour la préparation des vaccins contre SPPV sont Romania, Bakirkoy, Yougoslave RM65, KSGP O240 et KSGP O180, alors que les caprins sont vaccinés avec les souches de GTPV Gorgan, Mysore, Uttarkashi et KSGP O 240 [4].

En Afrique du Nord et au Moyen-Orient, la souche Romania est principalement utilisée pour protéger les ovins. Jusqu'à maintenant les vaccins inactivés ne sont pas commercialisés, Awad et *al*. [161] ont déclaré que la protection des animaux avec des vaccins CaPVs inactivés est non solide et de courte durée, ce qui nécessite un rappel tous les 6 mois. Cependant, Boumart et *al*. [162], ont évalué l'efficacité d'un vaccin inactivé à base de la souche Romania en concluant que le vaccin SPPV roumain inactivé confère une bonne protection, similaire au vaccin vivant.

Souche	Origine	Cellules	Nombre de passages	Références
SPV RM65	Ovine	Cellules de reins d'agneau	30	Ramyar and Hessami, 1968
SPV Romania	Ovine	Cellules de reins d'agneau	40	Precausta, 1979
SPV Bakirkoy	Ovine	Cellules de reins de bovin	32	Martin et al, 1973
SPV Rumania Fanar	Ovine	Cellules de testicules d'agneau	26	Penkova et al, 1974
SPV Perego	Ovine	Cellules de testicules d'agneau et cellules de reins de bovin	11 sur cellules de testicules d'agneau 10 sur cellules de rein de bovin	Mateva, 1975
SPV Ranipet	Ovine	Cellules de thyroides d'ovins	35	Anandan et al, 1972
GPV Gorgan	Caprine	Cellules de cortex rénal de caprins	-	Abbas et al, 2010
GPV Uttarkashi	Caprine	Cellules de testicules d'agneau et cellules Vero	34 sur cellules primaires et 26 sur Vero	Hosamani et al, 2004b
GPV Mysore	Caprine	Cellules de testicules d'agneau	25	Dubey and Sawhney, 1978
GPV Kedong	Ovine	Cellules de testicules d'agneau	-	Capstick, 1959
GPV Isiolo	Ovine	Cellules de testicules d'agneau	-	Capstick, 1959

Tableau2. Souches virales de SPPV et GTPV et nombre de passage d'atténuation [36].

7.3 Production des vaccins viraux

La production des vaccins viraux comprend plusieurs étapes illustrées par la figure 5.

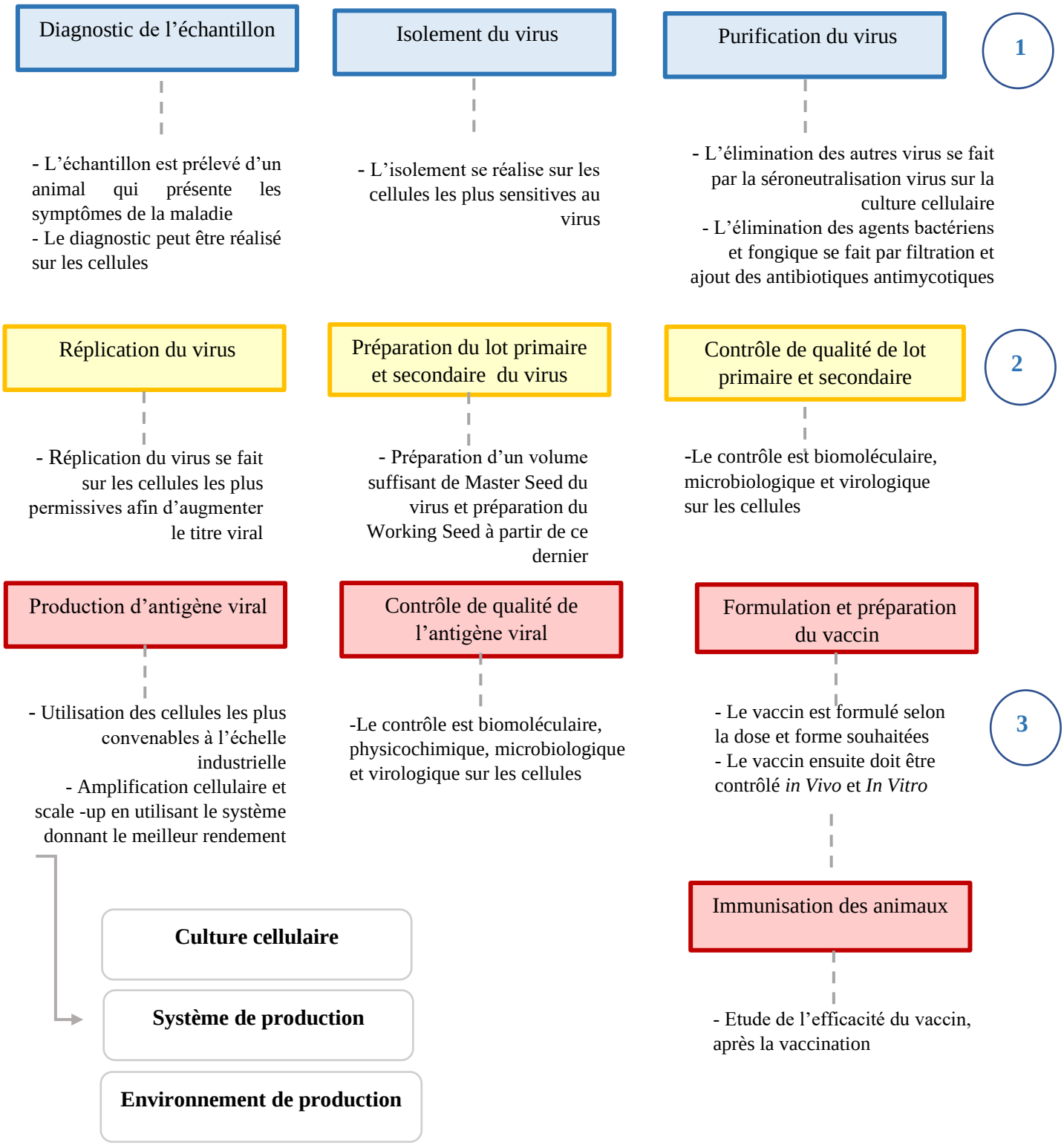


Figure5. Schéma explicative des différentes étapes de la production des vaccins Capripoxvirus

7.3.1 Différents types de cultures cellulaires utilisées pour la production des vaccins contre les Capripoxvirus

Historiquement, les vaccins ont été produits sur les cellules primaires, des tissus, des œufs fécondés et même des organismes entiers comme substrats pour la propagation du virus. Généralement les cultures cellulaires diffèrent d'un virus à un autre, il existe des cellules qui peuvent être sensibles pour un type viral et non permissives pour d'autres. Pour les cellules primaires il est préférable d'utiliser des cellules qui sont dérivées de l'animal hôte du virus, mais ce n'est pas le cas pour les lignées cellulaires.

a) Culture cellulaire d'origine ovine

- Cellules de peau

Des cultures de peau embryonnaire de mouton, ont été utilisées pour la propagation des CaPVs [163, 164]. Ces cellules donnent de très bons titres [165]. Cependant, ces cellules ne sont pas bien adaptées pour le virus SPPV, elles produisent un effet cytopathique qui ne peut pas être différencié de la dégénérescence cellulaire non spécifique [166].

- Cellules testiculaires

Les cellules testiculaires dérivées d'agneau de 3-5 mois ont été utilisées avec succès pour la propagation et la production des vaccines contre les Capripoxvirus [167]. Ces cellules confèrent le meilleur titre [168]. Généralement l'effet cytopathique comprend la rétraction et le ballonnement, la vacuolisation nucléaire, la formation de chromatine, la perte de continuité de la monocouche cellulaire et l'apparition des corps d'inclusion intracytoplasmiques basophiles et/ou éosinophiles [169].

- Cellules de la thyroïde

Il a été prouvé que les cellules thyroïdiennes d'agneau sont permissives au SPV et l'effet cytopathique observé est similaire à celui sur les cellules primaires de testicules d'agneau [170,171]. L'apparition de l'ECP commence à 3 jours avec des inclusions cytoplasmiques, après 5 à 8 jours les cellules se rétractent et se séparent. Le titre maximal de SPV a été obtenu après 3 jours post infection [172].

- Cellules rénales d'agneau

Ces cellules ont été exploitées pour la production des vaccins atténués contre les Capripoxvirus [167]. Après l'infection virale de ces cellules par un Capripoxvirus, l'ECP commence après 36h pi avec agrégation de cellules et apparition des inclusions intracytoplasmiques [173]. Le titre augmente de façon progressive après le 10ème passage [174]. Certains chercheurs n'avaient pas réussi à adapter ces virus sur ces cellules [175], tandis que d'autres ont observé des ECPs qui ne sont pas spécifiques aux CaPVs [176]. Ces ECPs non spécifiques consistent en cellules arrondies sans formation de foyers infectés montrant des corps d'inclusion intracytoplasmiques [177]. Cependant, il a été confirmé que ces cellules rénales d'agneau sont plus efficaces que les cellules rénales ovines. Alors que les cellules embryonnaires rénales d'ovine sont aussi exploitables pour la propagation des virus Capripox [178,179].

❖ Autres cellules

Romanenko a montré que le SPPV peut se propager dans les cellules embryonnaires des poumons d'agneau [180], ce Capripoxvirus a conservé son immunogénicité après 15 passages [181], Vigario a ajouté que le même virus est capable de se multiplier sur les cellules embryonnaires musculaires et les cellules du fœtus total d'agneau. Ces dernières ont été décrites par Vigario et *al.* pour l'adaptation et la multiplication virale du SPPV [182].

b) Culture cellulaire d'origine caprine

❖ Cellules testiculaires de petit caprin

Ces cellules ont été utilisées pour la croissance virale de GTPV ; l'effet viral a apparu entre 48h-72h après l'infection. Le titre le plus élevé de virus a été obtenu entre 96 et 120 heures lorsque les cellules présentaient 80 à 100 % d'ECP. L'ECP de ce virus sur ces cellules et les cellules testiculaires d'agneau sont similaires ; mais, les cellules testiculaires produisent plus de virus que ces cellules d'origine caprine [183].

❖ Cellules primaires rénales de chèvre

Ces cellules peuvent être utilisées pour la production des vaccines contre le LSDV. Naveen Kumar et al. [183] ont démontré que ces cellules sont les seules qui ont présenté ECP après 7 jours post infection, l'effet viral est apparu après 48–72 h pi et a été caractérisé par une rétraction cellulaire suivi d'un ballonnement et une dégénérescence après 96–120 h pi.

c) Culture cellulaire d'origine bovine

Les cellules embryonnaires rénales de veau ont été utilisées pour la préparation et l'atténuation du la souche Madagascan de LSDV. Elles sont permissives pour le virus SPPV mais elles sont moins sensibles par rapport aux cellules testiculaires d'agneau [184, 185, 186]. Le passage de SPPV sur ces cellules rénales permet l'atténuation et la perte de l'immunogénicité du virus après 12 passages [179].

D'autres types cellulaires ont servi à la production de souches vaccinales ; il s'agit des cellules de poumon de veau [188], des cellules embryonnaires de peau et de muscle de veau [189]; cependant, les cellules de peau se contaminent facilement [318], les cellules musculaires provoquent les anticorps neutralisants [190].

d) Culture cellulaire d'autres origines

Les cellules rénales de lapin ont été exploitées pour l'atténuation de la souche de Malgache [191]. Les Capripoxvirus peuvent se multiplier aussi sur les cellules dérivées de tissu de porc ; cellules rénales, testiculaires, embryonnaires musculaires et dermiques [192]. Des lignées cellulaires ont été utilisées également pour la production des vaccins contre les Capripoxvirus comme la lignée cellule Vero et BHK21 [193,194].

7.3.2 Systèmes de production des antigènes viraux

Au cours du développement de la culture cellulaire et la production virale, plusieurs systèmes ont été inventés, la technologie a commencé en utilisant les systèmes stationnaires qui sont des systèmes manuels nécessitant plusieurs personnes pendant la manipulation. Afin de remplacer le mode manuel, des bioréacteurs ont été développés durant ces dernières années; toutefois certains bioréacteurs donnent une densité cellulaire importante mais un rendement viral faible, ce qui rend le système stationnaire plus favorable pour la multiplication de certains virus.

a) Systèmes stationnaires

Il existe deux types de système stationnaire : un système à un seul étage et un système à étages. Pour le système à un seul étage, les flacons et les tubes de culture tissulaire sont en verre ou polystyrène avec une surface de 5 à 200 cm^2 et peuvent contenir jusqu'à 150 ml de milieu. Bien que quelques procédés utilisent encore cette méthodologie, la nécessité de passer à des unités plus grandes est évidente et est abordée en augmentant le ratio de surface au volume. C'est ainsi qu'on

est passé des flacons stationnaires aux flacons roulants dynamiques mesurant jusqu'à 1750 cm^2 et utilisant 350 ml de milieu et un volume de 2,5 L [195]. Cette technique de flacons roulants est encore largement utilisée, tant en laboratoire de recherche qu'en industrie [196]. Elle est également utilisée pour produire des poxvirus [197,198]. Néanmoins, certaines lignées cellulaires ne peuvent pas être cultivées avec succès dans des bouteilles roulantes en raison des agglutinations ou étalements inadéquats sur la surface totale ; d'où l'intérêt d'un autre système de production qui est le système stationnaire à étages. Dans ce dernier, les plateaux mesurant 335 × 205 mm (600 cm^2) sont en étages de 1, 2, 10 et 40. Le plus grand a une surface de 24 000 cm^2 et nécessite 8 L de milieu de culture. Ce système comprend également un oxygénateur, des pompes et un contrôleur de pH, d'O_2 et du niveau. Enfin la surface de croissance avec ce système peut aller jusqu'à 340 000 cm^2 [199].

b) Les bioréacteurs

Ce sont de véritables systèmes de processus unitaires, analogues en volume et performances aux processus de cuve de culture en suspension pour les cellules adhérentes. On distingue plusieurs types de bioréacteurs :

- Bioréacteur avec agitation pneumatique (airlift) :

Dans ce type de bioréacteurs, le milieu de culture supplémenté en CO_2 est continuellement perfusé dans la suspension cellulaire. Les cellules sont maintenues en suspension grâce à l'agitation provoquée par l'air soufflé, les effets de cisaillement sont généralement plus faibles [200] ; mais, le mouvement et l'éclatement des bulles de gaz peuvent être dommageables pour les cellules.

Ce système a une mise à l'échelle jusqu'à 100 L; mais il présente des inconvénients en particulier la difficulté de récolter des cellules du lit, c'est un système qui peut être idéal pour les cultures continues à long terme plutôt que pour les cultures discontinues.

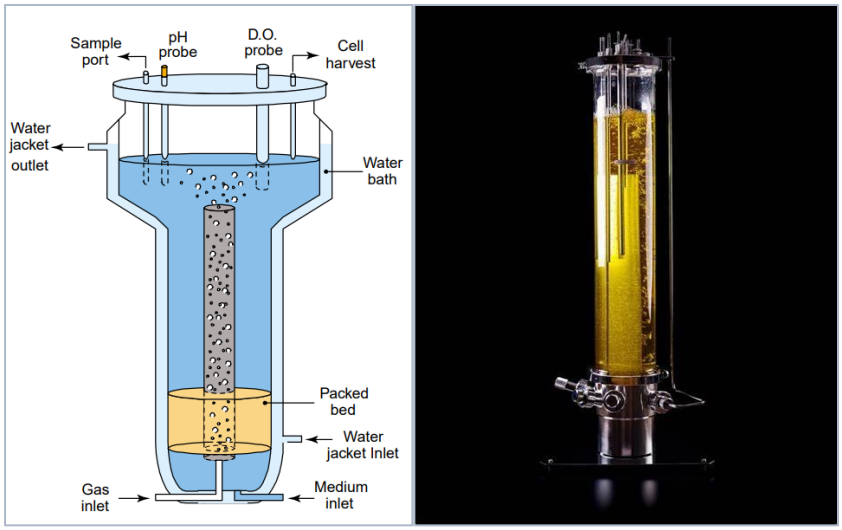


Figure 6.1. Schéma expliquant les différentes parties du bioréacteur avec agitation pneumatique 2. Photo réelle du bioréacteur avec agitation pneumatique [200]

❖ Bioréacteur à agitation

Il s'agit de bioréacteur dans lequel l'agitation et le transfert de masse, d'oxygène et de chaleur dans le milieu de culture sont réalisés par injection d'air [201]. Les microporteurs, conçus pour favoriser l'attachement cellulaire, permettent l'augmentation du rapport surface/volume par rapport à d'autres technologies de culture de cellules adhérentes avec un rendement cellulaire et viral plus élevé et un coût de production réduit [202]. La taille et la densité des microporteurs influence de manière directe la facilité avec laquelle les porteurs sont maintenus en suspension, la rapidité avec laquelle ils sédimentent pour permettre le lavage et le changement du milieu [203]. De plus, ce type de microporteurs est lié à la conception du bioréacteur ; à petite échelle, de 10 à 20 ml jusqu'à 1 à 2l. Mais, ce volume peut aller jusqu'à 36 l avec des microporteurs composés de grandes Spinners. Ce type de système est utilisé par la culture, des cellules Vero pour la production de Sheepox virus (Khaled et *al*. 2014) et les résultats ont montré que le titre est amélioré de 5,875 à 7,375 TCID50/ml [204]. Cependant, la densité cellulaire n'est pas améliorée par ce système à cause de l'accumulation des métabolites toxiques dans le milieu et le stress lié au cisaillement [205]. Ce problème peut être surmonté par l'usage de bioréacteur à lit fluidisé [206], dont les porteurs sont séparés de l'agitation directe, ce qui évite les forces de cisaillement élevées. De plus, les bioréacteurs à lit fluidisé fournissent une interface de transfert très élevée, puisque les cellules

et le fluide sont en déplacement continu [207], ce qui en fait un meilleur système de production de grande échelle qui peuvent aller jusqu'à 500 litres [208].

❖ Bioréacteur à fibres creuses (Hollow fiber)

Ce type de bioréacteur consiste en un faisceau de fibres creuses polymères parallèles et assemblées dans un cylindre [210]. Le principe de ce bioréacteur a été décrit pour la première fois par Knazek [211]. Les cellules sont cultivées en suspension ou fixées à la surface externe des membranes dans l'espace extracapillaire. Le Milieu de culture contenant des nutriments s'écoule dans la lumière des fibres et se diffuse à travers les pores de la paroi de la fibre jusqu'aux cellules. Les métabolites ainsi que les déchets produits par les cellules retournent dans les fibres et sont retirés du compartiment cellulaire [212].

Ce bioréacteur offre plusieurs avantages pour la culture des cellules adhérentes ; le rapport surface/volume est élevé, les cellules sont protégées de la contrainte de cisaillement.



Figure 7. Schéma expliquant les différentes étapes de la mise à grande échelle [209]

Généralement, des polymères hydrophiles ou à mouillabilité modérée sont utilisés pour le développement de bioréacteurs à fibres creuses afin de favoriser l'adhésion des cellules ou l'échange du milieu. Cependant, des fibres creuses hydrophobes (ex. polypropylène) sont incluses dans certains appareils pour une oxygénation séparée des cellules [213]. Ce bioréacteur est couramment appliqué dans la culture de cellules d'hybridome pour produire un anticorps monoclonal et les protéines recombinantes [214, 215]. Il a été utilisé aussi pour la récolte des virus qui sont cultivés en mode perfusion [216].

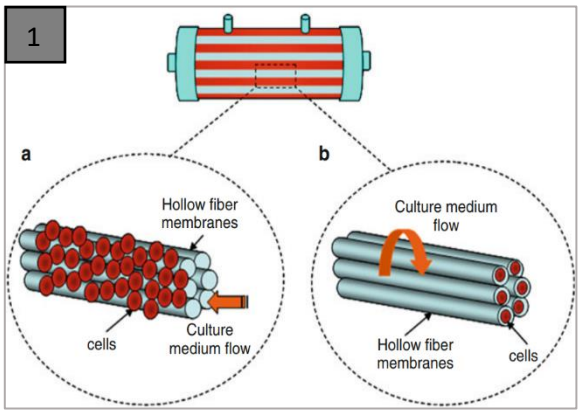




Figure 8.1 1Schéma expliquant le principe du bioréacteur à membrane à fibres creuses utilisé pour la culture et la croissance cellulaire : (a) les cellules sont cultivées dans l'espace extra capillaire, (b) les cellules sont cultivées dans le lumen de la fibre, [217]. 2. Photo réelle du bioréacteur à fibres creuses [218]

❖ Bioréacteur rotatif de culture cellulaire (RCCS)

Dans les années 1990, la NASA a développé un système rotatif de culture cellulaire (RCCS) qui utilisait un bioréacteur à paroi rotative (RWVB), dans lequel la cuve de culture se compose d'un intérieur tournant autour de l'axe central pour suspendre les cellules et une cartouche externe fixe [218].

Ce système rotatif introduit un concept révolutionnaire en simulant la microgravité, les cellules sont maintenues dans une suspension fluide dynamique dans un milieu liquide mélangé par des forces hydrodynamiques minimales. Le sens de gravité des cultures peut être modifié de manière aléatoire lors de la rotation, ce qui réduit la gravité de l'environnement cellulaire et simule l'environnement de microgravité de l'espace [219]. Les forces de turbulence et de cisaillement du fluide sont minimisées par le fait que le récipient est complètement rempli de fluide et fournit une aération à travers une membrane semi-perméable qui élimine les bulles [220]. Il a été montré que les cellules cultivées dans le bioréacteur RWV sont plus résistantes à l'infection virale, nécessitant une multiplicité virale d'infection (MOI) plus élevée pour infecter de manière productive les agrégats 3D (Fig.9) par rapport à la culture cellulaire monocouche conventionnelle [221,222]. De même, les cellules cultivées dans ce bioréacteur montrent une résistance accrue à l'infection

bactérienne, par rapport aux infections dans la culture cellulaire monocouche conventionnelle [223].

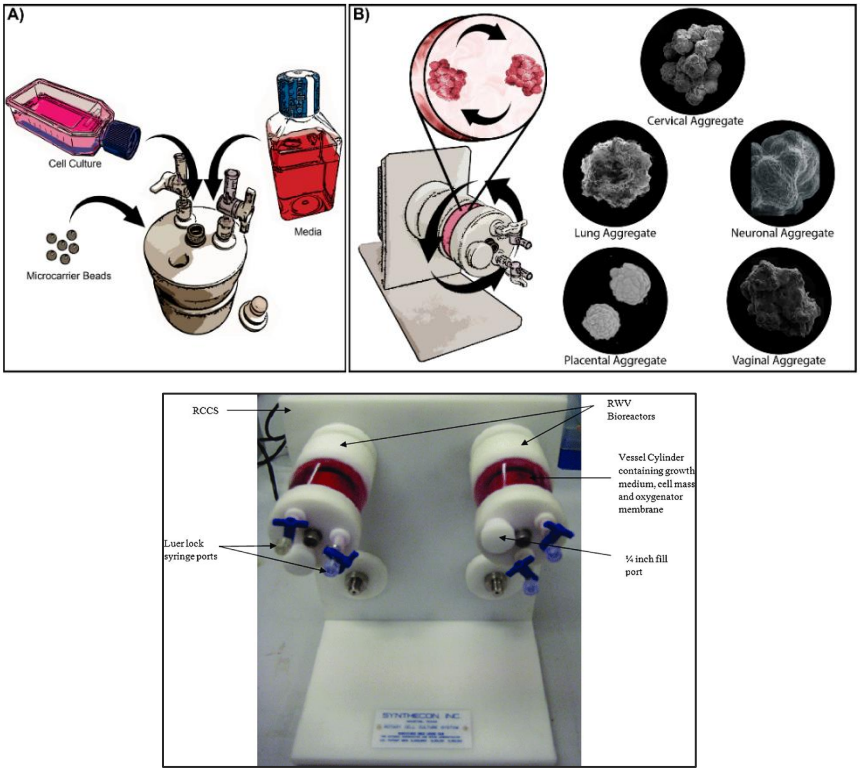


Figure 9.1 Culture tridimensionnels (3D) dans le bioréacteur à paroi rotative ; (A) Les cellules sont cultivées à confluence dans des cultures cellulaires monocouches conventionnelles bidimensionnelles (2D), sont ensuite combinés avec des billes de microporteurs et le milieu de culture dans le bioréacteur. (B) L'aspect de différent type d'agrégats cellulaire. 2- photo réelle du bioréacteur rotatif [221, 224]

- Bioréacteur à vague (Bioréacteur Wave)

Le système est un dispositif de culture cellulaire qui a été largement utilisé pour la production de protéines recombinantes dans des lignées cellulaires en culture batch, semi-batch et perfusion. Le milieu de culture et les cellules sont chargés dans un sac stérilisé à usage unique. Le bioréacteur est placé sur une base basculante électrique [224]. Le mouvement de bascule de cette base induit des ondes dans le fluide de culture cellulaire à l'intérieur du bioréacteur pour fournir un mélange et un transfert efficace de gaz. L'environnement résultant dans le bioréacteur peut facilement donner une densité élevée en cellules ; cependant, ce système est plus approprié pour les processus à petite et moyenne échelle avec des cellules à faible demande en oxygène [225]. Le bioréacteur ne nécessite aucun nettoyage ou stérilisation, offrant une utilisation facile et une protection contre la contamination croisée. L'aération de surface alimentant les cellules en

oxygène est effectuée, le stress hydrodynamique des cellules dû à l'éclatement des bulles d'air est éliminé [226].

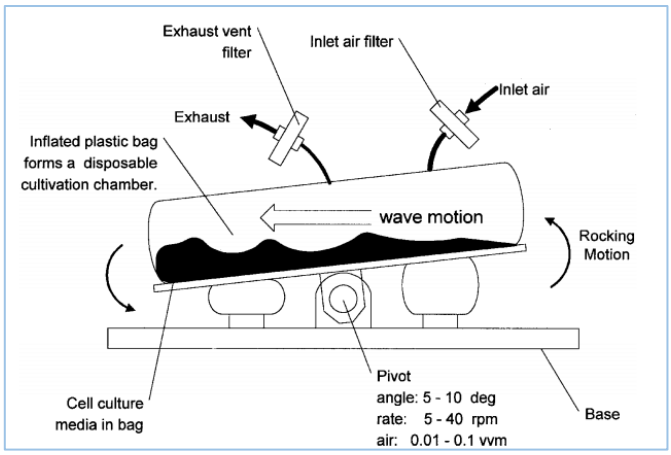




Figure 10.1 Shema explicative de bioréacteur Wave, 2- Photo réelle du bioréacteur Wave [227]

❖ Bioréacteur à lit fixe (Packed-Bed)

C'est un système de perfusion qui permet la croissance de cellules en suspension immobilisées dans des macroporteurs ou des fibres formant une structure 3D à l'intérieur du réacteur [228]. Le milieu de culture est perfusé à l'aide d'un réservoir externe. Un bioréacteur à l'échelle du laboratoire (CelCradle™) a été utilisé avec succès pour la production de plusieurs types de virus [229, 230, 231, 232, 233, 234,235] et des études ont rapporté l'efficacité de ce système sur la densité cellulaire et sur les titres viraux. Cette efficacité est expliquée par la grande surface, le faible cisaillement et la bonne aération offerts par ce système. C'est un bioréacteur à usage unique capable de produire des cultures cellulaires à haute densité pour la production de vaccins, protéines recombinantes et anticorps monoclonaux.

Les bioréacteurs à lit fixe offrent une croissance relativement importante dans un petit volume, ce qui peut économiser le temps de culture. Cependant, un inconvénient de ces systèmes est qu'il n'est pas possible de prendre l'échantillon directement. De plus, le mélange et l'homogénéité de la culture est difficile à évaluer. Mais cet obstacle peut être surmonté par un témoin de petit volume [236].

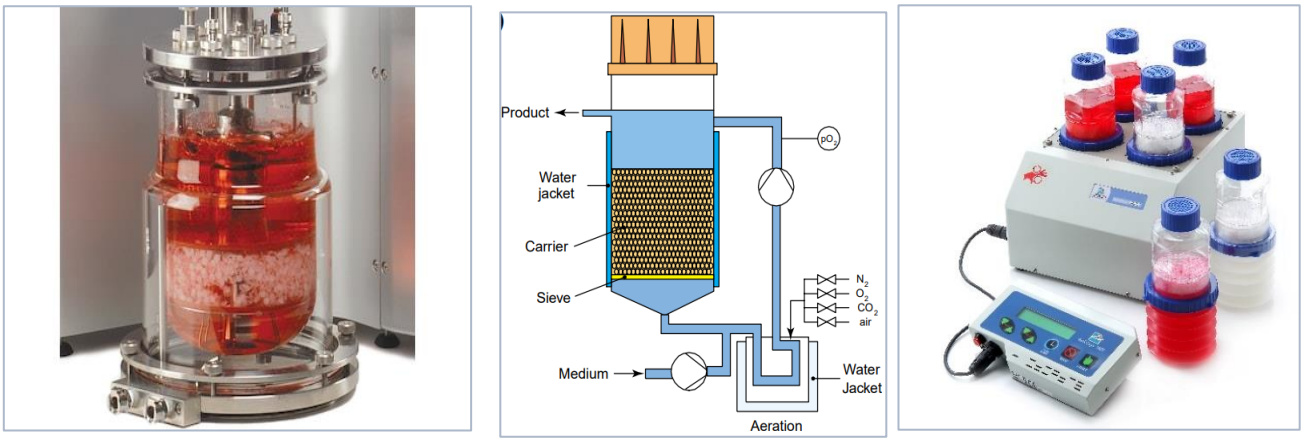


Figure 11. 1 Bioréacteur a lit fixe à grande échelle. 2- Bioréacteur a lit fixe à l'échelle laboratoire.

7.3.3 Maintien de la culture cellulaire et virale

Il est important de maintenir les cellules dans des conditions optimales pour la production virale tout au long du processus afin de produire une grande quantité de virus. Ceci peut être obtenu en ajustant plusieurs paramètres tout au long de la culture. Ces paramètres sont les paramètres physicochimiques (température, pH, densité optique, pression osmotique, et force de cisaillement), la multiplicité virale de l'infection (MOI), le temps d'infection et le milieu de culture.

a) Effet des paramètres physicochimiques sur la culture cellulaire

La température souhaitée pour les cultures cellulaires dépend de la température corporelle de l'espèce et du microenvironnement à partir duquel les types de cellules cultivées ont été isolés. Alors que la plupart des lignées cellulaires humaines et de mammifères sont incubées à 36–37 °C, les lignées cellulaires provenant d'animaux à sang froid peuvent être maintenues à des températures entre 15 °C et 26 °C [238]. Pour les CaPVs la multiplication optimale se fait à une température de 35° C [239, 240].

Le niveau de pH de la plupart des lignées cellulaires humaines et de mammifères cultivées en laboratoire doit être maintenu à un niveau de pH physiologique de 7.2 à 7.4. En revanche, certaines lignées cellulaires de fibroblastes préfèrent des conditions légèrement plus alcalines entre pH 7.4 et 7.7, tandis que les lignées cellulaires transformées préfèrent des environnements plus acides entre pH 7.0 et 7.4 [241]. De plus, les fluctuations des concentrations atmosphériques de CO2 peuvent également modifier le niveau de pH. Les cellules doivent donc être cultivées dans des incubateurs qui permettent également d'ajuster les tensions de CO2 à 5-7 % [242]. Enfin, pour retarder les changements de pH, le glucose peut être remplacé par une autre source de carbone telle que le galactose ou le fructose. Bien que cela ralentisse le taux de croissance cellulaire, cela réduira également l'accumulation de sous-produits tels que l'acide lactique [243].

Concernant les forces de cisaillement, dues à l'agitation et au barbotage, elles peuvent impacter la production des virus dans les bioréacteurs. Le système de culture doit être optimisé pour assurer une répartition homogène tout en limitant les contraintes de cisaillement [244]. Actuellement, il y a de nouveaux bioréacteurs qui peuvent surmonter l'influence de la contrainte de cisaillement [245]. Les forces de cisaillement sont beaucoup plus faibles dans la culture adhérente que dans la culture en suspension. Par conséquent, les méthodes de réduction de la contrainte de cisaillement dans la culture en suspension doivent être explorées pour améliorer le rendement en virus dans la culture à grande échelle [246].

b) Pression osmotique

La pression osmotique est un autre exemple de signal biophysique qui module la fonction cellulaire. Les changements de pression osmotique ont été largement associés à l'arrêt de la croissance et à la prolifération cellulaire [247]. En général, les cellules animales sont plus sensibles au stress osmotique que les autres cellules en raison de l'absence de paroi cellulaire et un faible mécanisme de régulation du stress osmotique [248]. C'est pour cette raison la plupart des milieux de culture cellulaire sont conçus pour avoir une osmolarité de 280 à 330 mOsmol kg-1 en équilibrant la concentration des nutriments et des osmolytes [249].

c) Multiplicité virale de l'infection (MOI) et temps de l'infection

La MOI décrit le rapport entre le virus infectieux et le nombre de cellules viables au moment de l'addition du virus. Il a été démontré que la manipulation de MOI et le temps d'infection est un outil puissant pour améliorer la production virale [250,251]. Le virus se propage

principalement dans la cellule cible par conséquent, la dégradation/inactivation du virus avant qu'il atteigne la cellule cible doit être pris en compte lors du calcul du temps optimal d'inoculation du virus [252]. De plus, pour la plupart des virus, si la quantité de particules virales par la cellule unitaire est trop élevée au moment de l'infection, cela pourrait conduire à la réplication de particules défectueuses, réduisant la production maximale de virus [383]. La MOI et temps d'infection diffèrent d'un virus à un autre, des MOI de 0,0001 pourraient être utilisés pour produire le virus de la fièvre catarrhale du mouton ; Cependant pour les CaPVs l'inoculation se fait avec une MOI de 0.01 [240, 241].

d) Milieu de culture

Le milieu de culture est le facteur le plus important dans la culture cellulaire ; il permet la survie, la prolifération et les fonctions cellulaires ; sa qualité affecte directement le taux de production virale. Il est donc essentiel de sélectionner un milieu approprié qui convient à la croissance de chaque type cellulaire [253].

À l'aube de la technologie de la culture cellulaire, les principaux composants des milieux étaient des produits d'origine naturelle. Le domaine s'est ensuite progressivement déplacé vers l'utilisation de milieux synthétiques à base de produits chimiques. Aujourd'hui, des cellules d'importance industrielle peuvent être cultivées en milieu synthétique. Néanmoins, les combinaisons et les concentrations des composants dans ces milieux restent à optimiser [254].

❖ Milieu naturel

En 1882, Sydney Ringer a développé la solution de Ringer, une solution saline équilibrée avec une composition proche de celle des fluides corporels ; il a réussi à maintenir en vie des cœurs de grenouille [255]. Cet essai a été considéré comme le premier cas de culture *in vitro* de tissu animal. La composition de la solution de Ringer est simple et ne comprend que des sels inorganiques, parfois du glucose ajouté [256]. En 1907, Ross G. Harrison a réussi la culture des fibres nerveuses d'une grenouille dans un liquide lymphatique [257]. En 1909 Burrows a découvert que la lymphe ne convient pas à la culture de cellules d'animaux à sang chaud et l'a remplacée par le plasma qui est devenu un milieu de culture majeur pour une variété de cellules animales. En 1913 Carrel, a constaté que l'ajout d'extrait embryonnaire au plasma sanguin peut augmenter considérablement la prolifération cellulaire et prolonger la période de culture de fibroblastes du cœur d'embryon de poulet [258]. Cependant, la composition de la lymphe, du plasma et de l'extrait

embryonnaire est inconnue ce qui affecte la survie et la croissance cellulaire. Ceci a conduit à la recherche de milieux synthétiques de composition connue et favorisant la croissance [259].

❖ Milieu synthétique

Le milieu synthétique est composé du milieu basique supplémenté par des facteurs de croissance, des hormones et du sérum [255].

Après sélection expérimentale, le milieu le plus simple est le milieu minimum essentiel (MEM), qui contient plus de 20 types de substances divisé en 4 sous-groupes. Le tableau 3 renseigne sur ces sous-groupes du milieu minimum essentiel (MEM) [260].

Tableau 3 Composition d'un milieu minimum essentiel (MEM) [260]

Groupe	Composants
Sel inorganique	CaCl2, KCl, MgSO4, NaCl, NaHCO3, NaH2PO4
Acide aminé	Arginine, cystine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, histidine, tyrosine et valine.
Vitamine	polyoxométalates partiels de calcium, chlorure de choline, acide folique, inositol, nicotinamide, pyridoxine, riboflavine, thiamine
Glucide	Glucose

❖ Sérum

Le sérum modifie les conditions d'un substrat de culture, permettant l'adhérence aux cellules pour qu'elles prolifèrent facilement [261]. Le sérum fœtal bovin (FBS) est le sérum le plus appliqué dans la culture cellulaire parce qu'il est riche en facteurs de croissance et contient de faibles niveaux de γ-globulines qui ont une activité inhibitrice de la croissance cellulaire. D'autres types de sérum sont utilisés tels que le sérum de veau et le sérum de cheval. Cependant, la composition du sérum est toujours indéfinie et donc il y a une grande variation d'un lot à un autre et un fort risque de contamination par des virus [262]. De ce fait des substituts de sérum sont recherchés et il a été démontré qu'une combinaison de plusieurs hormones et des facteurs de croissance sont un efficace substitut du sérum [263].

❖ Facteurs de croissance

Des facteurs de croissance ont été découverts dans les années 1960 ; ces facteurs sont des facteurs de croissance nerveuse, épidermique, des analogues à l'insuline, des fibroblastes (FGF), des dérivés de plaquettes, et des facteurs de croissance transformant (TGF) [264, 265, 266,267]. L'ajout de ces facteurs de croissance à un milieu de culture augmente de façon considérable la prolifération cellulaire.

❖ Hormones

La première utilisation des hormones dans la culture cellulaire a été en 1931 par Semura et *al*. qui ont observé que les fibroblastes de poulet ont connu une augmentation de la croissance cellulaire après l'ajout d'antuitrine et de thyroxine à la culture [268]. L'efficacité de l'insuline et de la thyroxine a été également démontrée sur des fibroblastes [269].

Certaines hormones végétales sont similaires aux hormones animales. Les effets de ces hormones sur les cellules animales sont devenus récemment un objet de recherche important. Il a été prouvé que l'auxine et la kinétine ont un effet positif sur les cellules HEK293 et NIH3T3. Pour l'acide gibbérellique, il existe un nombre limité de publications décrivant son effet sur les cellules de mammifères ; cependant, une étude a prouvé que cette phytohormone a un effet positif sur la croissance des cellules A431 (carcinome épidermoïde humain) et HaCaT (kératinocytes humains immortalisés) [270,271].

7.4 Etude d'efficacité des vaccins contre les CaPVs

La vaccination est le moyen le plus efficace pour contrôler la propagation des CaPVs, seuls les vaccins vivants atténués sont actuellement utilisés. Des études immunologiques pour le suivi de la vaccination des CaPVs ont montré que la vaccination stimule à la fois l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire [272]. La réponse immunitaire humorale peut être étudiée en utilisant le test de neutralisation du virus (VNT), le test d'anticorps fluorescent indirect (IFA) et ELISA [273] et d'autres tests immunologiques tels que CIE, le test d'agglutination au latex et le test d'immunodiffusion sur gel d'agar et Western blot. Cependant ; ils ont montré une faible sensibilité [274, 275,276].

Partie pratique

Chapitre I : Développement du substrat cellulaire pour l'isolement, la propagation et la production des Capripoxvirus

1. Détermination de cellules alternatives et efficaces pour l'isolement et la propagation des Capripoxvirus

Cette partie de la thèse a donné lieu à une publication, dans le journal of Virological Methods

Comparative sensitivity study of primary cells, vero, OA3.Ts and ESH-L cell lines to lumpy skin disease, sheeppox, and goatpox viruses' detection and growth

Doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114164. Epub 2021 Apr 14

2. Développement des cellules diploïdes pour meilleur titre des Capripoxvirus

Cette partie de la thèse a donné lieu à une publication, dans le journal Archives of Virology.

Poxvirus Sensitivity of a Novel Diploid Sheep Embryonic Heart Cell Line

Doi: 10.21203/rs.3.rs-2589443/v1

Chapitre I : Développement du substrat cellulaire pour l'isolement, la propagation et la production des Capripoxvirus

Les Capripoxvirus sont les agents responsables de maladies animales graves chez les bovins (LSDV), les ovins (SPPV) et les caprins (GTPV) [277,55]. L'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA) classe ces maladies comme étant à déclaration obligatoire en raison de leur potentiel de propagation rapide et de leur impact socio-économique important [6].

La vaccination est le moyen le plus efficace de contrôler la propagation des CaPVs soutenu par d'autres mesures telles que l'abattage sanitaire et les restrictions de mouvement des animaux. Seuls les vaccins vivants atténués sont actuellement utilisés [43].

La première étape de la production d'un vaccin est l'isolement viral et la réplication virale ; ces derniers nécessitent les cellules les plus permissives pour le virus concerné. Actuellement, les cellules primaires de rein ou de testicule d'agneau sont les plus couramment utilisées pour la prolifération des CaPVs [7]. Cependant, la préparation des cellules primaires est un processus lourd et compliqué conduisant à des lots irréguliers et difficiles à standardiser. De plus, les cellules primaires peuvent être la source d'agents étrangers et une contamination potentielle du vaccin [278]. Plusieurs auteurs ont essayé d'adapter les CaPVs sur des lignées cellulaires continues telles que les cellules Vero (isolées à partir de cellules épithéliales de rein de singe vert africain), les cellules MDBK (isolées à partir des cellules épithéliales du tubule rénal de chien) et la lignée cellulaire OA3.Ts (isolée à partir de testicules d'ovins) [7, 279]. Néanmoins, ces cellules présentent de nombreux inconvénients tels qu'un faible titre viral. Or, la validation d'une lignée cellulaire continue appropriée pour les Capripoxvirus est basée sur leur utilisation pour l'isolement, la propagation et la réplication du virus et sur leur application aux méthodes d'immunocoloration pour la confirmation de l'infection. Il était, donc, indispensable de rechercher d'autres types de lignées cellulaires répondant à ces critères**.**

Récemment, L'institut Friedrich-Loeffler (FLI), principal organisme fédéral allemand de recherche sur la santé animale, a développé une lignée cellulaire à partir de peau embryonnaire de mouton (ESH-L) qui semble très sensible à la croissance et à la réplication des CaPVs. Les cellules ESH-L peuvent également être congelées dans de l'azote liquide et maintenues au moins pendant 40 passages sans perdre leur sensibilité et leur rendement cellulaire.

Ce chapitre vise: La comparaison de la sensibilité de différents types de cellules aux trois Capripoxvirus : LSDV, SPPV et GTPV. Les cellules intéressées par l'étude sont des cellules primaires issues de différents organes (cœur, peau, rein et testicule) et les lignées cellulaires Vero, Ovine Testis (OA3.Ts) et ESH-L. Nous avons testé la sensibilité pour l'isolement du virus, le cycle de réplication et le titrage, révélés par l'effet cytopathique (CPE), la coloration immunoenzymatique et l'immunofluorescence.

- L'isolement et la purification des cellules diploïdes et leur évaluation pour la cryoconservation, la détermination de leur cinétique cellulaire et pour la production des poxvirus avec des titres élevés.

1. Détermination de cellules alternatives et efficaces pour l'isolement et la propagation des Capripoxvirus

Les cellules primaires de testicule d'agneau LT ont été obtenues par castration d'un agneau de trois mois. Alors que les cellules primaires de cœur, de peau et de rein ont été préparées à partir de tissus de fœtus d'agneau de trois mois. Les tissus ont d'abord été soigneusement nettoyés avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) additionnée d'une solution antibiotique-antimycotique de culture cellulaire à 5 % (Cat : 15240062), et placés séparément dans des plaques. Les tissus sont ensuite soumis à une dissociation mécanique (avec un bistouri stérile) et enzymatique par la trypsine EDTA (0.25%) pour obtenir des cellules individuelles. Les flacons de cellules ont été mis dans un bain marie à 31°C avec une agitation douce. Toutes les 10 min, le surnageant est recueilli dans des flacons puis diluées dans Le milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) avec 10 % du FBS (Fetal bovine serum), et incubé à 37 ˚C avec 5% de CO_2.

Concernant les lignées cellulaires, les cellules Vero (rein de singe vert africain, Cat n◦ : CCL-81) et les cellules OA3. Ts (Ovine Aries Testis CRL-6546) ont été fournies par l'ATCC. Les cellules ESH-L (Peau d'embryon de mouton) ont été obtenues auprès de FLI (Cat n◦ : CCLV RIE 0175). Les trois lignées cellulaires ont été cultivées dans Le milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) avec FBS et incubé à 37 ˚C avec 5% CO_2.

Pour la croissance cellulaire toutes les cellules ont été cultivées avec une concentration initiale de 40 000 cell/cm^2 et ont été observées quotidiennement pour déterminer le temps nécessaire pour chaque cellule d'atteindre la confluence et le rendement cellulaire.

Quinze échantillons positifs par PCR prélevés dans la phase aiguë des maladies à CaPVs à partir des tissus inflammatoires, des nodules et des croûtes ont été utilisés pour la détection virale. Tous les échantillons étaient également positifs pour l'isolement sur les cellules primaires (cœur embryonnaire d'agneau et testicule) après un passage. Les échantillons prélevés des chèvres, des moutons et des bovins infectés ont été testés par qPCR. Les échantillons ont été dilués dans du PBS, centrifugés et le surnageant a été conservé pour inoculation sur des cellules confluentes. Après 45 min d'adsorption, les cellules LT et ESH-L inoculées ont été incubées et observées quotidiennement pour la présence de CPE par trois analyses différentes.

Le test quantitatif PCR en temps réel TaqMan ciblant le gène ORF074 codant pour la protéine d'enveloppe de virions matures P32 dans SPPV, GTPV et LSDV a été utilisé pour déterminer les charges virales dans les échantillons.

La deuxième étape était l'évaluation de toutes les cellules primaires et lignées cellulaires pour la réplication et la propagation des Capripoxvirus. Pour cela trois virus Capripox, souches atténuées, ont été utilisés pour la cinétique de croissance : la souche LSDV Neethling [280] la souche SPPV Romania [281] et la souche GTPV Gorgan [282]. Des flacons contenant les cellules primaires (cœur, rein, testicules, et peau) et de lignées cellulaires (Vero, MDBK, OA3.Ts et ESH-L) ont été infectés par ces souches (MOI 0,01) et récoltées quand l'effet cytopathique (CPE) est d'environ 80 %. Pour déterminer la cinétique de croissance du virus, le milieu et les cellules ont été récoltés séparément pour la PCR et le titrage jusqu'au 7ème jour après l'infection. Le titre d'infectiosité de la suspension de virus Capripox a été déterminé à l'aide de la méthode de titrage TCID50 basée sur l'observation directe de l'ECP.

Les cellules primaires ont été ensemencées avec 40 000 cellules/cm^2, qui permettent d'obtenir des cellules confluentes après 3 à 4 jours avec une densité cellulaire de 180 000 cellules/cm^2. Pour les cellules embryonnaires du cœur, 160 000 cellules/cm^2 ; pour les cellules embryonnaires de peau, 120 000 cellules/cm^2 et pour les cellules testiculaires 100 000 cellules/cm^2. Les cellules embryonnaires du cœur peuvent atteindre le nombre de passages le plus élevé (20) suivies des cellules cutanées puis des cellules rénales et testiculaires.

Pour la détection de virus dans des échantillons inoculés sur des cellules LT et ESH-L, le CPE a été observé sur 15 échantillons passés sur LT et 13 échantillons passés sur les cellules ESH-L.

Concernant La propagation des CaPVs sur les cellules primaires et les lignées cellulaires, le titre le plus élevé est obtenu sur les cellules primaires du cœur, suivies des cellules ESH-L sans différence significative entre le LSDV et le SPPV.

Le titrage du virus dans les cellules et dans le surnageant a montré une quantité élevée de virus intracellulaire comparativement au virus extracellulaire.

Les résultats nous ont permis de tirer une conclusion importante sur les cellules les plus efficaces pour la croissance et le contrôle des Capripoxvirus. Ce sont les cellules ESH-L qui peuvent être une alternative efficace aux cellules primaires pour la croissance et le contrôle des Capripoxvirus. Nous signalons que Jusqu'à présent aucun travail n'a été effectué pour évaluer l'efficacité de cette lignée cellulaire pour l'isolement, la croissance et le titrage des CaPVs par rapport aux cellules primaires.

Journal of Virological Methods 293 (2021) 114164

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

Comparative sensitivity study of primary cells, vero, OA3.Ts and ESH-L cell lines to lumpy skin disease, sheeppox, and goatpox viruses detection and growth

Halima Rhazi [a,b,*], Najete Safini [b], Karima Mikou [a], Meryeme Alhyane [b], Matthias Lenk [c], Khalid Omari Tadlaoui [b], Mehdi Elharrak [b]

[a] Laboratory of functional and environmental ecology, Faculty of Sciences and Technology Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Imouzzer Road, BP 2202 Fez, Morocco
[b] Laboratory of Research and Development virology, MCI Animal Health, Lot. 157, Zone Industrielle Sud-Ouest (ERAC) B.P: 278, 28810 Mohammedia, Morocco
[c] Departement of Experimental Animal Facilities and Biorisk Management, Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Südufer 10, D-17493, Greifswald, Insel Riems, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Capripoxviruses
Cell culture
Cell sensitivity
ESH-L cells
Primary cells
Immunoenzymatic staining and immunofluorescence

ABSTRACT

Lumpy skin disease virus (LSDV), sheeppox virus (SPPV) and goatpox (GTPV) virus have been usually grown on primary cells for diagnosis, production and titration purposes. The use of primary cells present several inconvenient, heavy preparation, heterogeneous cell population, non-reproducible viral titration and presence of potential endogenous contaminants. Therefore investigating sensitivity of candidate continuous cell lines is needed.

In this study, we compared the above Capripox viruses (CaPVs) sensitivity of primary cells of four origin (heart, skin, testis and kidney), with three cell lines (Vero, OA3.Ts and ESH-L). We tested sensitivity for virus isolation, replication cycle and titration, revealed by cytopathic effect (CPE), immunoenzymatic staining and immunofluorescence.

Our results show that ESH-L cells and primary fetal heart cells present the highest sensitivity for CaPVs growth and detection. Vero cells can replicate those viruses but without showing any CPE while the titer obtained on OA3.Ts is lower than primary and ESH-L cells. ESH-L cells are an effective alternative to primary cells use for growing Capripoxviruses and their diagnosis.

1. Introduction

Capripox viruses are the causative agents of serious animal diseases in cattle (Lumpy Skin Disease), sheep (Sheeppox) and goats (Goatpox) (Haegeman et al., 2019a; Tuppurainen et al., 2017).The World Organization for Animal Health (OIE) categorizes these diseases as notifiable due to their potential for rapid spread and substantial socio-economic impact (Tuppurainen et al., 2017).The three viruses cause contagious diseases with papule and pustule lesions of the skin and mucous membranes, reduced milk yield, mastitis and infertility. The mortality rate can sometimes be high amongst lambs due mainly to secondary bacterial infections (Diallo and Viljoen, 2007).

Vaccination is the most effective way to control the spread of CaPVs supported by other measures such as stamping out and animal movement restrictions. Only live attenuated vaccines are currently used (Kitching, 2003). Currently, primary lamb kidney or primary lamb testis cells are the most commonly used for CaPVs proliferation and vaccine production (Babiuk et al., 2007). However, primary cells preparation is a heavy and complicated process leading to irregular batches difficult to standardize. In addition, primary cells may transmit extraneous agents and potential vaccine contamination (Babiuk et al., 2008). Several authors tried to adapt CaPVs on continuous cell lines such as Vero, MDBK

Abbreviations: LSDV, Lumpy skin disease virus; SPPV, Sheeppox virus; GTPV, Goatpox virus; CaPVs, Capripox viruses; OA3.Ts, Ovine testis; ESH-L, Embryonic skin of sheep; CPE, cytopathic effect; FLI, Friedrich-Loeffler Institut.

* Corresponding author at: Laboratory of functional and environmental ecology, Faculty of Sciences and Technology Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Imouzzer Road, BP 2202 Fez, Morocco; Laboratory of Research and Development virology, MCI Animal Health, Lot. 157, Zone Industrielle Sud-Ouest (ERAC) B.P: 278, 28810 Mohammedia, Morocco.
E-mail address: h.rhazi@mci-santeanimale.com (H. Rhazi).

https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114164
Received 5 February 2021; Received in revised form 9 April 2021; Accepted 10 April 2021
Available online 14 April 2021
0166-0934/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

and OA3.Ts cells (Babiuk et al., 2007; Mahmoud et al., 2016). Nevertheless, they have many of disadvantages such as low viral titer. The validation of suitable continuous cell line for capripoxvirus is based on their use for virus isolation, propagation and replication and their application for immunostaining methods for infection confirmation.

Recently, investigators from Federal Research Institute for Animal Health, the Friedrich-Loeffler Institut (FLI) developed a cell line from embryonic skin of sheep (ESH-L) that appear to be highly sensitive to CaPVs growth and replication. ESH-L cells could be also frozen in nitrogen liquid and maintained at least for 40 passages without losing their sensitivity and cellular yield.

Our work focuses on the comparison of the sensitivity of 4 primary cells of different tissues (heart, skin, kidney and testis) with Vero, Ovine Testis (OA3.Ts) and ESH-L cell lines to three capripoxviruses LSDV, SPPV and GTPV).

2. Material and methods

2.1. Cells

Primary lamb testis cells LT were obtained by castration of a healthy three-month-old male. Heart, skin and kidney primary cells were prepared from three-month-old fetus lamb tissues.

The tissues were first cleaned carefully with phosphate buffered saline (PBS) added with 5% Antibiotic- Antimycotic solution, and placed into plates separately. The tissues were then cut into small pieces, and submitted to enzymatic dissociation by trypsin to obtain single cells using trypsin. The Erlenmeyer flasks of cells were put in a 31 °C water bath with a gentle agitation. After every 10 min, the supernatant was collected in dedicated flasks. Cells were diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (Wisent Inc, cat n° 219−015-XK) supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), and incubated at 37 °C with 5% CO_2.

The protocol for obtaining primary cells from animals was submitted and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

Vero cells (African green Monkey kidney, Cat n°: CCL-81) and OA3. Ts cells (Ovine Aries Testis CRL-6546) were provided by ATCC. ESH-L (Embryonic sheep skin) cells were obtained from FLI (Cat N°: CCLV-RIE 0175). The three cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Wisent Inc, cat n° 219−015-XK), supplemented with 5% FBS for Vero cells and supplemented with 10 % FBS for OA3.Ts and ESH-L, and incubated at 37 °C with 5% CO_2.

2.2. Viruses

Fifteen PCR positive field samples representing inflammatory tissues, nodules and crusts taken in the acute phase of CaPVs diseases were used for viral detection. All samples were also positive for isolation on primary cells (lamb embryonic heart and testis) after one passage. Three Capripox viruses, attenuated strains, were used for growth kinetic in this study: LSDV Neethling strain(Capstick. and Coackley, 1961), SPPV Romania strain (Precausta et al., 1979), and GTPV Gorgan strain (Sciences et al., 2010).

2.3. Virus isolation

Specimens collected from infected goats, sheep and cattle and tested by qPCR, and only positive ones were stored at −80 °C until use. specimen were diluted in PBS, centrifuged for 20 min at 2000 rpm (4 °C), and the supernatant was retained for inoculation on confluent cells (500 µL/F25 cm^2). After 45 min of adsorption, inoculated LT and ESH-L cells were incubated at 35 °C, 5% CO_2 and observed daily for CPE presence by three different analysts.

2.3.1. Virus detection by PCR

DNA was extracted from 200 µl of viral suspension samples using isolate II genomic DNA kit (Bioline), and eluted in 100 µl of elution buffer according to the manufacturer's instructions.

A quantitative real-time PCR (qPCR) TaqMan assay targeting ORF074 gene coding for mature virions envelope protein P32 within SPPV, GTPV and LSDV, was used to determine viral genetic loads in samples. Reactions were performed in 96-well Optical Reaction Plates (Applied Biosystems), contained 10 µl Luna Universal probe QPCR Master Mix, 500 nM each capripoxvirus primer, 250 nM of capripoxvirus probe, 4 µl of template and nuclease free water to 20 µl. Reactions were run on the Quant Studio1 System (Applied Biosystems) using the following amplification program: 95 °C for 10 min; and 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Obtained results were generated by determination of the threshold cycle (Ct).

2.4. Virus propagation and kinetics

Confluent flasks of primary cells and cell lines were infected by the attenuated strains (MOI 0.01) and harvested when cytopathic effect (CPE) is about 80 %. To determinate the virus growth kinetic, every incubation day, the media and cells were separately harvested for PCR and titration until D7 post infection (pi). "heart, ESH-L" is removed

2.5. Cells sensitivity evaluation

Evaluation of cell sensitivity was based on virus titration and PCR. The infectivity titer of the Capripox viruses' suspension was determined using three methods: the TCID50 titration method based on direct CPE observation as described in the OIE Terrestrial Manual (Chapter 2.7.14) (World organization for Animal Health Chapter 2.7.14., 2009), the immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) (Haegeman et al., 2019b), and the immunofluorescence assay (Gari et al., 2008).

For the IPMA method, cells were fixed with cold 4% paraformaldehyde then with 30:1 methanol/30 % H_2O_2 mixture for 30 min. After the second fixative was removed, the plates are washed with PBS, and the anti-Capripoxvirus serum was added (anti-LSDV Neethling strain, anti-SPPV Romania strain, and anti-GTPV Gorgan strain (Precausta et al., 1979). After 1 h of incubation, the wells were washed with PBS containing 0.1 % Tween 20 (PBST), and the secondary antibody, conjugated to horseradish peroxidase ((for LSDV: Anti-Bovine IgG-peroxidase, for SPPV: Anti-Sheep IgG-peroxidase, for GTPV: Anti-Goat IgG-peroxidase; Sigma Aldrich) was added, and the plates are incubated for 1 h at 37 °C. After a final wash, the revelation was done and the staining was analyzed using an inverted contrast microscope.

The immunofluorescence antibody assay was used to localize the virus replication site inside the cells, and for virus detection in microtitration plates. Briefly, the medium was discarded from the plate, cells were fixed with cold 4 % paraformaldehyde for 10 min, and 100 µL of Triton X-100 (Sigma Aldrich) was added. After 20 min, the plate was washed with PBS containing 0.1 % Tween 20 (PBST), and primary antibodies added (positive anti-LSDV, anti-SPPV and anti-GTPV serums). After1 h of incubation, the plate was washed again and rabbit anti-mouse dye-light 594 (Bethyl Laboratories, Inc.) was added at 1:500, and incubated 1 h at 37 °C. The fluorescence signal was analyzed using an Olympus fluorescence microscope, and the viral titer was calculated using the Reed & Muench method (1938) (Reed and Muench, 1938), wells that display fluorescent foci were designated positive, and replication site of virus localized.

3. Results

3.1. Cell growth

Primary embryonic and testis lamb cells were seeded with 40 000 cell/cm^2, which allow to obtain confluent cells after 3–4 days with a cell density of 180 000 cell/cm^2 cell/cm^2 for embryonic heart, 160 000 cell/cm^2 for embryonic skin, 120 000 cell/cm^2 for testis, and 100 000 cell/cm^2. Primary cells growth at an average yield and then drop slowly

during subcultures. Embryonic heart cells can achieve the highest passage number (20) followed by skin cells then kidney and testis cells (Table 1).

3.2. Virus isolation

Primary cells can cause viral contamination, moreover heart cells present higher risk. LT cells preparation is less heavy operation and they can be supplied easily from newborn lamb, in comparison with heart fetal cells preparation.

Samples were tested using LT cells and ESH-L cells. Results of virus detection in samples inoculated on LT and ESH-L cells are reported in Table 2. CPE was observed on 15 samples passed on LT and 13 samples passed on ESH-L cells. The two negative samples on ESH-L, one in goat and one in sheep were also negative by PCR.

3.3. Virus propagation and kinetic

Three CaPVs attenuated strains were propagated in primary cells and cell lines, and their sensitivity evaluated by CPE characteristic, infectious titer and precocity of the virus harvest. All CaPVs, at the used MOI (0.01) developed a CPE starting the second day of incubation and picking between the 3 and 5 days.

Observation of the CPE after immunoenzymatic staining is easier than the direct observation as shown in Fig. 1.

LSDV produce intracytoplasmic inclusion bodies, syncytia and intranuclear inclusion bodies in cell culture. At advanced stage of virus propagation, the monolayer is destroyed with infected cells rounding up and detaching from the surface. For SPPV and GTPV viruses, the CPE was characterized by rounding, retraction and ballooning of cells, nuclear vacuolation, chromatin fragmentation, loss of continuity of the cell monolayer, and intracytoplasmic inclusion bodies. The CPE was characterized by cells that became refractory and ragged in appearance, with retraction of the cell membranes from surrounding cells.

When ESH-L cells are used for conventional titration, the results can be shown in 3 days, and in 2 days when they are used for immunostaining technics, unlike Heart cells the results are given after 5 days and 6 days for LT cells. For Vero cells, the results can be given also in 3 days but the titer obtained by conventional titration is always 2 log lower than the titer obtained by immunostaining technics.

SPPV and GTPV are detected by fluorescence mainly in the cytoplasm as shown in IFA staining images (Fig. 2).

CaPVs propagation on primary cells and cell lines was evaluated in Table 3, results were validated statistically after 3 repetitions of the same cells with the same virus ($p > 0.01$). There is a clear difference between the titer obtained on primary cells/ESH-L and the titer obtained in Vero/OA3.Ts, the difference may reach 2.5 log for LSDV and GTPV, and 2 log for SPPV. For the three viruses, the highest titer is obtained on Heart primary cells, followed by ESH-L cells with no significant difference between LSDV and SPPV.

Virus titration in ESH-L cells and in the supernatant showed high amount of intracellular virus comparatively to extracellular virus, the difference is 1.4 for LSDV, 1.7 for SPPV and 2.0 for GTPV (Fig. 3). The highest titer obtained on day 3 (LSDV), day 4 (SPPV) and day 5 (GTPV). The titer drop around 0.5 log in 3 days (D4 to D7).

Table 1
Primary lamb cells maximum passages.

Cells	First passage	Last passage	Max passages
Testis	120 000	50 000	14
Embryonic Kidney	100 000	60 000	14
Embryonic Skin	160 000	80 000	18
Embryonic Heart	180 000	80 000	20

Table 2
Results of qPCR positive clinical samples passed on LT and ESH-L cells for virus detection.

Sample origin	qPCR Ct	Virus detection of cells	
		LT	ESH-L
Cattle 1	20.9	P	P
Cattle 2	21.6	P	P
Cattle 3	20.0	P	P
Cattle 4	18.8	P	P
Cattle 5	20.2	P	P
Sheep 1	N	P	N
Sheep 2	23.8	P	P
Sheep 3	27.9	P	P
Sheep 4	20.7	P	P
Sheep 5	243	P	P
Goat 1	17.2	P	P
Goat 2	25.8	P	P
Goat 3	25.9	P	P
Goat 4	20.7	P	P
Goat 5	N	P	N

P: positive, N: negative.

4. Discussion

Vaccines against Capripoxviruses are currently produced using primary cells of ruminant origin such as lamb testis cells, fetal bovine muscle, fetal bovine skin, goat kidney, and fetal bovine lung cells (House et al., 1990; Binepal et al., 2001) Their preparation is a heavy and time-consuming operation with irregular performance. The use of primary cells for vaccine production also represents a risk of adventitious virus transmission, such as bovine viral diarrhea agent (BVD) (Merten, 2002). Moreover, this practice harm animal's welfare.

A continuous Vero cell line has been an objective pursued by several authors for CaPVs replication. They were used for the growth of GTPV isolates in 2010 (Venkatesan et al., 2010), the multiplication of GTPV in 2017 (Roy et al., 2017), and propagation of SPPV in 2019 (Enkhbaatar et al., 2019). Vero cells were adapted for LSDV vaccine production, however it has been proved non efficient because of poor replication in animals (LSD, 2021; Getachew et al., 2015).

Another cell line (OA3.Ts) has been evaluated for CaPVs propagation, however the titer was low (4.8/mL for SPPV), the growth was slow and its pestivirus status is unclear (Babiuk et al., 2007). Recent studies evaluated the use of MDBK cells for LSDV replication, for GTPV isolation and for SPPV vaccine production (Faya et al., 2020; Wallace and Viljoen, 2002; Möller et al., 2019; Munyanduki et al., 2020). The obtained titer of SPPV is 5.75/mL but the status of this cell line is not confirmed free from BVD (Uzar et al., 2020; ECACC, 2021; ATCC, 2021).

In our study, primary lamb cells originated from four tissues were prepared and tested comparatively with 3 cell lines (Vero, OA3.Ts and ESH-L) for CaPVs isolation, propagation and life cycle. ESH-L cells were more specific than primary testis cells in virus isolation as confirmed by qPCR, because probably primary cells may present false positive due to recurrent viruses or cell heterogeneity (Kengla et al., 2017). In addition, primary cells can develop CPE artifacts, which make the determination of true positive samples impossible to identify without additional immunostaining or PCR confirmation. In 2018, ESH-L cells were used by Asmelash Rassew et *al.*, for LSDV isolation on 6 skin biopsies and characteristic CPE was observed in infected cells within 5 days of incubation after one blind passage. Samples were all positive on ESH-L cells and by PCR (Tassew et al., 2018), which is in concordance with our results. The use of ESH-L cells may increase virus isolation efficacy when dealing with field samples.

Even if the sensitivity has been investigated in this study, we can presume that ESH-L cells are as sensitive as primary cells to isolate virus from field samples. Primary cells are known to be the most sensitive for virus isolation, which mean that they are able to detect the lowest concentration of the virus present in the sample. To confirm sensitivity

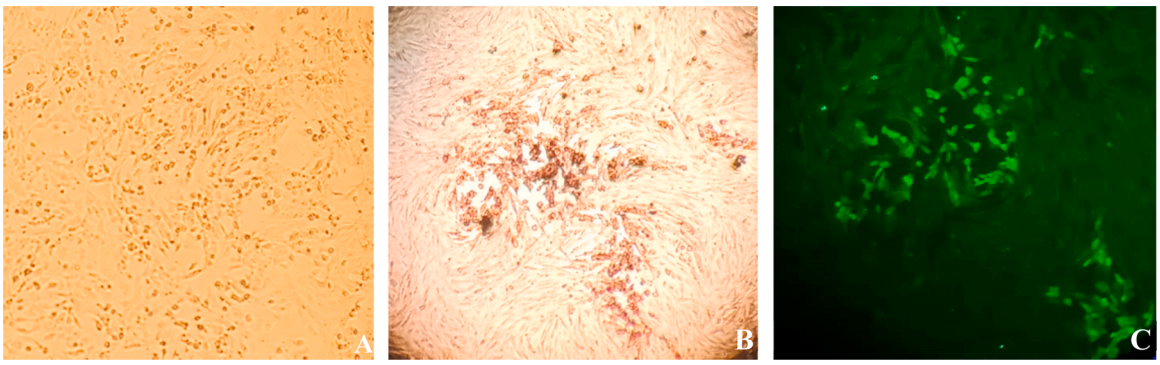


Fig. 1. Immunostaining of CaPVs produced on ESH-L cells.
A: CPE of LSD virus/ESH-cell. **B**: CPE IPMA staining of LSD virus/ESH-L cells. **C**: CPE IFA staining of LSD virus/ESH-L cells.

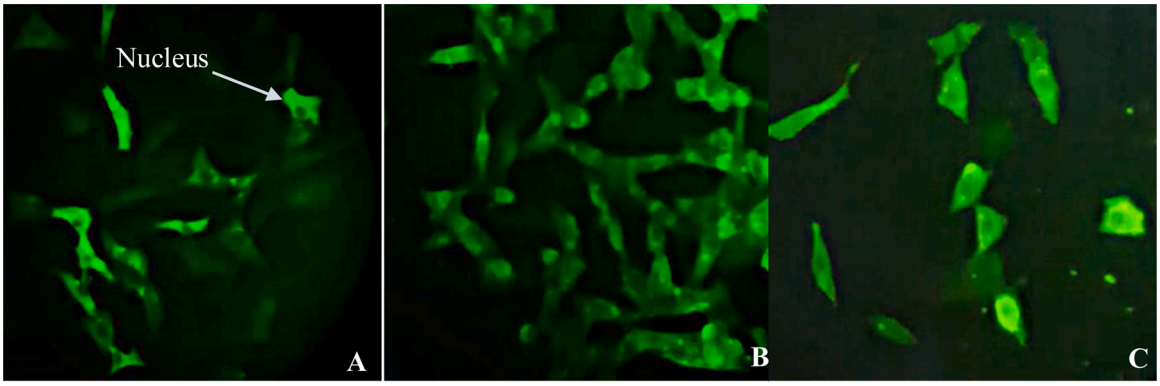


Fig. 2. CaPVs localization in ESH-L cells.
A: SPPV virus ESH-L cells. **B**: GTPV in ESH-L cells. **C**: LSD in ESH-L cells (x200)

Table 3
Capripoxviruses titers on primary cells (Heart/Skin/Kidney/Testis) Cells, ESH-L, Vero and OA3.Ts cell lines.

	Cells	LSDV	SPPV	GTPV
Primary cells	LT	6.8 ± 0.1	7.4 ± 0.05	6.7 ± 0.10
	Kidney	6.7 ± 0.05	6.9 ± 0.15	5.5 ± 0.05
	Skin	6.3 ± 0.10	7.2 ± 0.05	6.3 ± 0.05
	Heart	7.0 ± 0.05	7.6 ± 0.05	7.6 ± 0.05
Cell lines	ESH-L	7.0 ± 0.05	7.4 ± 0.05	7.2 ± 0.05
	OA3.Ts	4.6 ± 0.10	5.8 ± 0.05	4.0 ± 0.06
	Vero	4.8 ± 0.05	5.4 ± 0.05	6.4 ± 0.05

Data are expressed as mean ± S.D. (n = 3, number of repetition for each type of cells).

of both ESH-L and primary cells, it is recommended to use samples with PCR Ct (< 35) which has not been performed in this study. Therefore, further work should be done to show the sensitivity of the cells for diagnostic purpose.

Among primary cells, heart origin cells were the most sensitive to the virus replication, followed by LT cells. Replication is higher with heart cells than testis cells; however, heart cells present a higher risk of viral transmission as reported by Parsonson et al. for Akabane virus (Parsonson et al., 1988). In addition, LT cells can be supplied from newborn lamb, which make cells more available than heart fetal cells.

Among the three cell lines tested, ESH-L were able to generate the highest level of virus as showed by viral titration of the three CaPVs. On OA3.Ts cells titers are lower than ESH-L, almost similar to titers obtained on Vero, except the fact that CPE is clear on OA3.Ts and absent on Vero cells and need to be detected by immunostaining. It can be explained by the fact that Vero cells are from green kidney monkey origin not normally affected by CaPVs genus. Growth of viruses in both

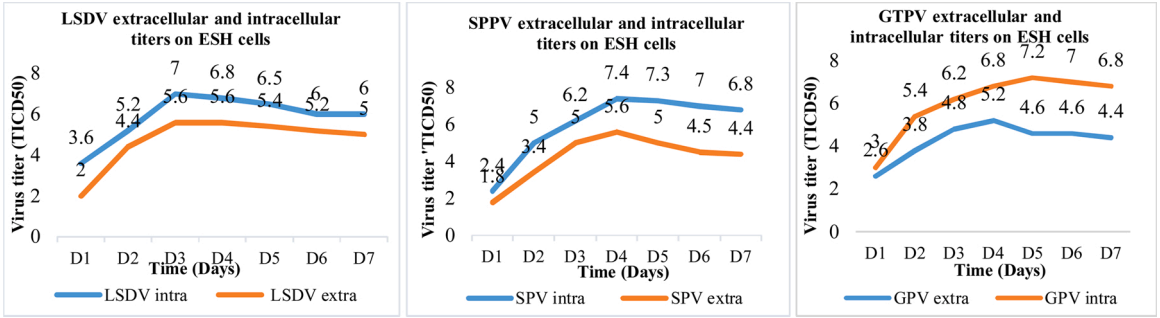


Fig. 3. Kinetics of Extracellular and Intracellular Capripoxviruses on ESH-L cells.

ESH-L and heart cells is detected by a CPE characterized by body inclusions in cytoplasm and likely to be also nuclear as shown by immunofluorescence staining. CaPVs can replicate on Vero cells but without CPE, those cells have been largely used for growth of poxvirus family specially Orthopox genus members such as Vaccinia and Camelpox. For those viruses, adaptation on Vero cells is not needed (Abdellatif et al., 2014).

In this study, viral titration was revealed by conventional CPE nonspecific method and the anti-serum immunostaining method. The last allowed easier and earlier visualization of the viral effect (3 days rather than 6 days of incubation). The immunostaining method is specific and highly sensitive when used on ESH-L cells. Titration on primary cells is not convenient by this technique because of low cellular yield at advanced level of passages. ESH-L cells were used previously for CaPVs conventional titration only (Lamien et al., 2011), our work demonstrate that they can be used advantageously with IPMA and IFA technics.

During replication cycle in cells, the virus growth exclusively intracellular, very few particles are excreted in the media, almost 2-log difference in the infectious titer between intracellular and free virus in the media. The same was confirmed by Tuppurainen et al. in 2017 (Tuppurainen et al., 2017). Consequently, there is need to harvest adherent infected cells rather than supernatant media for virus production. On ESH-L cells, the virus can be harvested after 3–5 days of incubation rather than 4–6 days on heart cells, which is a benefit.

5. Conclusion

ESH-L cells are an effective alternative to primary cells for growing Capripoxviruses and their diagnosis. Until now, no work was carried out to evaluate the efficacy of this cell line for isolation, growth and titration of CaPVs comparatively to primary cells.

Author statement

The corresponding author is responsible for ensuring that the descriptions are accurate and agreed by all authors.

H.R, N.S and M.E: Writing the original draft preparation, H.R, N.S, and M.A: Lab work, M.L. and K.O.T: Editing the manuscript.

Authors' contributions

H.R, N.S and M.E: Writing the original draft preparation, H.R, N.S, and M.A: Lab work, M.L. and K.O.T: Editing the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

Not applicable

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article

Acknowledgements

Not applicable

References

Abdellatif, M.M., Ibrahim, A.A., Khalafalla, A.I., 2014. Development and evaluation of a live attenuated camelpox vaccine from a local field isolate of the virus. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 33, 831–838. https://doi.org/10.20506/rst.33.3.2321.

ATCC: MDBK, cat no CCL-22.

Babiuk, S., Parkyn, G., Copps, J., Larence, J.E., Sabara, M.I., Bowden, T.R., David, 2007. Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. J. Veterinary Diagnostic. 19, 486–491. https://doi.org/10.1177/104063870701900505.

Babiuk, S., Bowden, T.R., Boyle, D.B., Wallace, D.B., Kitching, R.P., 2008. Capripoxviruses : an emerging worldwide threat to sheep. Goats and Cattle. 55, 263–272.

Binepal, Y.S., Ongadi, F.A., Chepkwony, J.C., 2001. Alternative cell lines for the propagation of lumpy skin disease virus. Onderstepoort J. Vet. Res. 68, 151–153.

Capstick, P.B., Coackley, W., 1961. Protection of cattle against lumpy skin disease. Res. Vet. Sci. 2, 362–368. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2008.01043.x.

Diallo, A., Viljoen, G.J., 2007. Genus Capripoxvirus. Poxviruses, pp. 167–181.

ECACC General Cell Collection: MDBK, cat no 90050801.

Enkhbaatar, B., Ariunbold, G., Erdenechimeg, D., Enkhmandakh, Yo., Munkhgerel, B., Usukhgerel, S., Boldbaatar, B., 2019. The result of propagation of sheep and goat pox viral vaccine strains into vero cells. Mong. J. Agric. Sci. 26, 3–9. https://doi.org/10.5564/mjas.v26i01.1190.

Faya, P.C., Cooka, Ch.G., Wijesiriwardanaa, N., Torea, G., Comtetc, L., Carpentierc, A., Shihb, B., Freimanisa, G., Hagaa, I.R., Beard, P., 2020. Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) Cells Are a Suitable Cell Line for the Propagation and Study of the Bovine Poxvirus Lumpy Skin Disease Virus, 285: 113943. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113943.

Gari, G., Biteau-Coroller, F., LeGoff, C., Caufour, P., Roger, F., 2008. Evaluation of indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the diagnosis and screening of lumpy skin disease using Bayesian method. Vet. Microbiol. 129, 269–280. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.005.

Getachew, G., Getnet, A., Gizawa, D., Wubetea, A., Kidanea, M., Asgedoma, H., Bayissa, B., Ayelet, G., Oura, Ch.A.L., Roger, F., Tuppurainen, E.S.M., 2015. Evaluation of the Safety, Immunogenicity and Efficacy of Three Capripoxvirus Vaccine Strains Against Lumpy Skin Disease Virus, 33, pp. 3256–3261. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.035.

Haegeman, A., et al., 2019a. Overview of diagnostic tools for Capripox virus infections. Prev. Vet. Med. 104–704. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104704.

Haegeman, A., et al., 2019b. An Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA) for the detection of lumpy skin disease antibodies. J. Virol. Methods 77, 113800. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113800.

House, J.A., et al., 1990. The Isolation of Lumpy Skin Disease Virus and Bovine Herpesvirus- From Cattle in Egypt, 115, pp. 111–115. https://doi.org/10.1177/104063879000200205.

Kengla, C., Kidiyoor, A., Murphy, V., S.V, 2017. Kidney Transplantation, Bioengineering and Regeneration. Kidney Transplantation in the Regenerative Medicine Era. Chapter Bioprinting Complex 3D Tissue and Organs, pp. 957–971. https://doi.org/10.1111/ajt.15599.

Kitching, R.P., 2003. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. Dev Biol (Basel). 114, 161–167.

Lamien, Ch.E., Lelentaa, M., Goger, W., Silber, R., Tuppurainend, E., Matijevic, M., Luckins, A.G., Dialloa, A., 2011. Real Time PCR Method for Simultaneous Detection, Quantitation and Differentiation of Capripoxviruses, 171, pp. 1134–1140. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.10.014.

LSD – National Veterinary Institute (nvi.com.et), consulted on 12/01/2021.

Mahmoud, A., Khalafalla, A., Abdellatif, M., 2016. An epidemiological study of sheep and goat pox outbreaks in the Sudan. 2016. Food Biol. 5, 1–5. https://doi.org/10.19071/fbiol.2016.v5.3007.

Merten, O.W., 2002. Virus contaminations of cell cultures – a biotechnological view. Cytotechnology 39, 91–116. https://doi.org/10.1023/A:1022969101804.

Möller, J., Moritz, T., Schlottau, K., Krstevski, K., Hofmann, D., Beer, M., Hofmann, B., 2019. Experimental lumpy skin disease virus infection of cattle: comparison of a field strain and a vaccine strain. Arch. Virol. 164 https://doi.org/10.1007/s00705-019-04411-w, 2931–294.

Munyanduki, H., Douglass, N., Offerman, K., Carulei, O., Williamson, A., 2020. Influence of the lumpy skin disease virus (LSDV) superoxide dismutase homologue on host transcriptional activity, apoptosis and histopathology. J. Gen. Virol. 101, 645–650. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001423.

Parsonson, M., McPhee, D.A., Della-Porta, A.J., McClure, S., McCullagh, P., 1988. Transmission of Akabane virus from the ewe to the early fetus (32 to 53 days). J. Comp. Pathol. 99, 215–227. https://doi.org/10.1016/0021-9975(88)90073-4.

Precausta, P., Kato, F., Vellut, G., 1979. A new freeze-dried living virus vaccine against sheep-pox. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 1, 305–319.

Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 27 https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

Roy, P., Balakrishnan, S.J.S., Mahaprabhu, K.S.R., Maity, A.M.B., Karmakar, T.K.G.A.P., 2017. Molecular Epidemiology of Goat Pox Viruses, pp. 1–5. https://doi.org/10.1111/tbed.12763.

Sciences, P., et al., 2010. Production of Goat Pox Virus Vaccine From a Live Attenuated Goat Pox Virus Strain, 20, pp. 315–317.

Tassew, A., Assefa, A., Gelaye, E., Bayisa, B., Ftiwi, M., 2018. Identification and molecular characterization of lumpy skin disease virus in east hararghe and East Shoa Zone, oromia regional state. Arc J. Anim. Vet. Sci. 4, 1–16. https://doi.org/10.20431/2455-2518.0403001.

Tuppurainen, E.S.M., et al., 2017. Review: capripoxvirus diseases: current Status and opportunities for control. Transboundary and Emerging Diseases. Blackwell Publishing Ltd, pp. 729–745. https://doi.org/10.1111/tbed.12444, 64.

Uzar, S., Sarac, F., Gulyaz, V., Enul, H., Yilmaz, H., Turan, N., 2020. Comparison and efficacy of two different sheep pox vaccines prepared from the Bakirkoy strain against Lumpy Skin Disease in cattle. Preprint.

Venkatesan, G., Balamurugan, V., Singh, R.K., Bhanuprakash, V., 2010. Goat pox virus isolated from an outbreak at Akola, Maharashtra (India) phylogenetically related to

Chinese strain. Trop. Anim. Health Prod. 42, 1053–1056. https://doi.org/10.1007/s11250-010-9564-8.

Wallace, D.B., Viljoen, G.J., 2002. Importance of thymidine kinase activity for normal growth of lumpy skin disease virus (SA-Neethling). Arch. Virol. 147, 659–663. https://doi.org/10.1007/s007050200016.

World organization for Animal Health Chapter 2.7.14, 2009. Sheep pox and goat pox. Manual of Diagnostic Test and VaccinesforTerrestrial Animals, 6thed. OIE, Paris, pp. 1058–1068.

2. Développement des cellules diploïdes pour la production des Capripoxvirus

Le but de cette étude était de préparer et de purifier des cellules diploïdes dérivés d'EH de mouton et tester leur utilité pour la propagation de membres représentatifs du genre Parapoxvirus, Capripoxvirus et Orthopoxvirus

Après la préparation les cellules embryonnaires du cœur d'agneau comme mentionné avant, les cellules sont ensuite purifiées pour isoler une culture cellulaire pure et homogène. La suspension de cellules cardiaques primaires préparée a été ensemencée dans des flacons de culture à une densité de 2×10^6 cellules/ml et incubée à 37°C dans des incubateurs humidifiés avec 5% de CO_2 pendant 6 h. Après incubation, les milieux de culture contenant des cellules non adhérentes ont été placés et un milieu de culture DMEM à haute teneur en glucose et contenant 10 % de FBS. Lorsque la monocouche devient confluente, les cellules sont ensemencées dans un flacon de culture et incubées à 37°C. Les cellules sont cultivées en continu en utilisant seulement 5% de FBS jusqu'au 40ème passage. Afin d'examiner la cytologie et la morphologie des cellules, une coloration de Giemsa a été réalisée sur les cellules du cœur à partir du troisième passage. Pour ceci, le flacon contenant les cellules est rincé avec du PBS concentré une fois, fixé avec du méthanol pendant 10 minutes, coloré au Giemsa dilué (1/10) pendant 30 minutes puis examiné au microscope inversé. Lorsque les monocouches deviennent confluentes, les cellules sont trypsinées, amplifiées pour atteindre une densité cellulaire élevée.

Pour la cryoconservation, les cellules ont été trypsinées et puis centrifugées. Après élimination du surnageant, les cellules sont mises en suspension dans un milieu de cryoconservation dans des cryotubes (1 ml/cryotube) à -80 °C pendant quatre heures, puis dans de l'azote liquide jusqu'à utilisation. Ces cellules ont servi à l'évaluation de la viabilité cellulaire, de la cinétique de la croissance cellulaire, du rendement cellulaire et du temps de doublement cellulaire.

Pour estimer la possibilité de cryoconservation de cellules embryonnaires du cœur d'agneau

, la viabilité cellulaire a été évaluée après 1 jour, 7 jours, 30 jours, 90 jours, 180 jours, 365 jours et 730 jours de cryoconservation.

La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide de bleu trypan et calculée par la formule suivante :

% de cellules viables = [1,00 - (Nombre de cellules bleues ÷ Nombre de cellules totales)] × 100.

La cinétique de croissance cellulaire a été évaluée en ensemençant six flacons avec 40 000 cellules /cm^2 à 37 °C avec 5 % de CO_2. Chaque jour un flacon a été trypsiné, le rendement cellulaire et le temps de doublement cellulaire (DT) ont été calculés comme suit :

DT = ln2/μ, Où μ = ln-Xn - ln-Xn-1 /tn –tn-1.

t : temps de trypsination (heures), X : nombre de cellules à t

Afin de déterminer la limite de Hayflick (Hayflick limit) des cellules embryonnaires du cœur trois flacons F25 cm^2 ont été ensemencés avec 40 000 cellules /cm^2 et incubés à 37 °C avec 5 % de CO_2 pendant 4 jours. Ensuite, les flacons ont été trypsinées séparément et les rendements cellulaires ont été calculés. Les cellules ont été amplifiées et repiquées jusqu'à un rendement <90 000 cellules/cm^2.Le rendement cellulaire étant le nombre total des cellules/surface de flacon.

La partie virale visait la détermination du passage maximal possible pour la réplication des virus CPV, LSDV et ORFV sur les cellules embryonnaires du cœur. Pour se faire quatre flacons de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40 passages de cellules cardiaques ont été ensemencés (40 000 cellules/cm^2). Un flacon était dédié au contrôle et trois autres flacons étaient utilisés pour l'inoculation virale à un MOI de 0,01. La propagation des poxvirus sur différentes cellules Vero, OA3.Ts, ESH-L et LT est comparée à celle des cellules embryonnaires du cœur d'agneau. Pour chaque type cellulaire, trois flacons de 25 cm^2 ont été ensemencés avec 40 000 cellules/cm^2. Après trois jours d'incubation, les cellules ont été inoculées avec des souches LSDV Neethling, ORFV et CPV atténuées à 0,01 MOI. Après 45 minutes d'adsorption, les cellules inoculées ont été incubées à 37 °C avec 5 % de CO_2 et observées quotidiennement pour l'effet cytopathique. Les virus ont été récoltés lorsque l'ECP était de 80 %. Les flacons témoins sont préparés de la même façon mais sans infection virale.

Une méthode qualitative a été réalisée au cours de cette étude pour estimer la différence entre les cellules embryonnaires du cœur et les cellules primaires LT. Pour cela, quatre flacons de 25 cm^2 ont été ensemencés avec des cellules primaires de cœur d'agneau et de testicules primaires d'agneau (2 flacons/type de cellules). Un flacon de chaque type de cellule a été inoculé avec des souches atténuées de LSDV Neethling (MOI 0,01). Les autres flacons ont servi de témoins. Après 45 min d'adsorption, le surnageant contenant le virus a été éliminé et les flacons ont été révélés par le test d'immunoperoxidase (IPMA), en utilisant le sérum anti-SPPV comme l'anticorps primaire et l'anti-Sheep IgG-peroxydase comme l'anticorps secondaire. L'observation au microscope à contraste

inversé caractérise les puits positifs comme des monocouches non colorées et les puits négatifs comme des puits colorés en rouge. Le titre d'anticorps est calculé comme précédemment.

La viabilité des cellules embryonnaires du cœur isolées a été testée après cryoconservation dans de l'azote liquide, et le nombre de cellules viables dans la culture indique la possibilité de leur conservation. Plus, de 80% des cellules restent viables deux ans après la conservation, ce qui signifie qu'une préparation cellulaire peut suffire pour plus d'un an de production de virus. D'autres conditions cellulaires ont été étudiées, le temps de doublement cellulaire était de 24 h et la monocouche n'est devenue confluente qu'après 72 h. Le nombre de cellules est resté relativement constant avant la phase logarithmique. Cette phase se produit entre 24 et 72 h, qui est une période d'augmentation exponentielle du nombre de cellules et de la croissance de la population cellulaire due à une division continue. La phase stationnaire se produit entre 72 et 96 h. Dans notre étude, 45 passages ont été testés pour les rendements cellulaires afin de définir le passage optimal des cellules stockées avec un coefficient > 0,9 R^2, indiquant une forte corrélation positive. Les résultats ont confirmé que la division cellulaire a diminué à P38, P39 et P40 après avoir atteint la limite de Hayflick.

Le développement d'un CPE caractéristique fournit une indication précoce de la propagation du virus, ce qui a été confirmé par nos résultats, dans lesquels trois poxvirus se sont répliqués sur ces cellules avec des CPE spécifiques. L'ORFV et le LSDV produisent des corps d'inclusion intracytoplasmiques et provoquent une perte de continuité dans la monocouche cellulaire, produisant des syncytiaux et un détachement de cellules. Après avoir démontré que ces cellules étaient permissives à l'infection par le poxvirus, chaque passage cellulaire est pour la sensibilité virale. Nos résultats n'ont montré aucune différence significative dans la réplication de l'ORFV pour P5 à P15 (7,4 $\log_{10}TCID_{50}$/ml). De plus, les titres LSDV et CPV étaient stables de P5 à P20 (6,8 $\log_{10}TCID_{50}$/ml) et de P1 à P15 (7,6 $\log_{10}TCID_{50}$/ml), respectivement. Néanmoins, tous les titres viraux obtenus à P35 étaient supérieurs à ceux obtenus dans les cellules Vero. De plus, les titres viraux pour les cellules LT primaires étaient substantiels, mais toujours inférieurs à ceux des cellules embryonnaires du cœur (6,2 vs 7,4 log10 TCID50/ml pour ORFV, 6,8 vs 7,0 $\log_{10}$ TCID50/ml pour LSDV, et 6,0 vs 7,6 log10 TCID50/ml pour le CPV).

Dans cette étude, nous avons comparé également l'adsorption de LSDV sur des cellules embryonnaires du cœur et les cellules LT primaires à l'aide du test IPMA. Les cellules témoins ne présentaient aucune coloration spécifique et les monocouches témoins étaient plus claires que les

monocouches infectées. De plus, les cellules embryonnaires du cœur infectées ont produit une coloration plus intense que les cellules LT primaires infectées.

Archives of Virology (2023) 168:232
https://doi.org/10.1007/s00705-023-05855-x

ORIGINAL ARTICLE

Poxvirus sensitivity of a novel diploid sheep embryonic heart cell line

Halima Rhazi[1,2] · Ikram Tifrouin[2] · Karima Mikou[1] · Oumaima Belayadi[2] · Najete Safini[2] · Meryem Alhyane[2] · Khalid Omari Tadlaoui[2] · Matthias Lenk[3] · Mehdi Elharrak[2]

Received: 16 February 2023 / Accepted: 13 July 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2023

Abstract

Lumpy skin disease virus (LSDV), camelpox virus (CPV), and orf virus (ORFV) are members of the family *Poxviridae*. These viruses are usually isolated or produced in embryonated eggs or primary cells because continuous cell lines are less sensitive to infection. Disadvantages of the use of eggs or primary cells include limited availability, potential endogenous contaminants, and a limited ability to perform multiple passages. In this study, we developed a diploid cell culture from sheep embryonic hearts (EHs) and demonstrated its high proliferative and long-term storage capacities. In addition, we demonstrated its sensitivity to representatives of three genera of the family *Poxviridae*: *Capripoxvirus* (LSDV), *Orthopoxvirus* (CPV), and *Parapoxvirus* (ORFV). The cell culture had a doubling time of 24 h and reached 40 passages with satisfactory yield. This is comparable to that observed in primary lamb testis (LT) cells at passage 5 (P5). After infection, each poxvirus titer was 7.0-7.6 log $TCID_{50}$/mL for up to five passages and approximately 6.8, 6.4, and 5.6 for the three viruses at P6-P25, P30, and P40, respectively. The sensitivity of sheep EH cells to poxvirus infection did not decrease after long-term storage in liquid nitrogen and was higher than that of primary LT cells, which are used for capripoxvirus and parapoxvirus detection and growth, and Vero cells, which are used for orthopoxvirus detection and growth. Thus, EH diploid cells are useful for poxvirus isolation and production without embryonated eggs or primary cells.

Introduction

Lumpy skin disease (LSD) of cattle is one of the most widespread animal poxvirus infections and is caused by lumpy skin disease virus (LSDV), a member of the family *Poxviridae* and genus *Capripoxvirus.* It has a wide distribution, and infection with this virus can have serious economic consequences, such as reduced milk production, weight loss, skin damage, and temporary or permanent infertility [1]. Camelpox, caused by camelpox virus (CPV), a member of the family *Poxviridae* and genus *Orthopoxvirus*, is a highly contagious disease with high mortality and morbidity in young and adult camels in Africa, India, and the Middle East [2–4]. The World Organization for Animal Health categorizes LSD and camelpox as notifiable diseases [5]. Contagious ecthyma, also known as contagious pustular dermatitis or orf, is an acute dermatitis that affects sheep, goats, and camels. It is caused by orf virus (ORFV), a member of the family *Poxviridae* and genus *Parapoxvirus.* It has a worldwide distribution and threatens human health as well [6].

Rapid pathogen isolation and culture are critical for the early diagnosis, prevention, and control of pox diseases. Cells that are susceptible to virus replication are critical tools for viral disease diagnosis and follow-up studies. Vaccination is the most effective way to control poxvirus spread, especially when supported by other measures, such as stamping out and restricted animal movement. Historically, vaccine manufacturers have used primary cells, tissues, fertilized eggs, and even whole organisms as substrates for virus propagation [7]. Embryonated chicken eggs

Handling Editor: William G Dundon.

✉ Halima Rhazi
rhazihalima.2020@gmail.com

[1] Laboratory of Functional and Environmental Ecology, Faculty of Sciences and Technology Sidi Mohammed, Ben Abdellah University, BP 2202, Imouzzer Road, Fez, Morocco

[2] Laboratory of Research and Development Virology, MCI Animal Health, B.P: 278, Lot. 157, Zone Industrielle Sud-Ouest (ERAC), 28810 Mohammedia, Morocco

[3] Department of Experimental Animal Facilities and Biorisk Management, Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Südufer 10, 17493 Greifswald, Insel Riems, Germany

Published online: 18 August 2023

(ECEs) have been widely used for isolating LSDV, CPV, and ORFV [8–11]. Moreover, ORFV has been successfully isolated from primary cells originating from chicken eggs [12]. Primary lamb kidney and testis cell cultures are commonly used for isolating all of the capripoxviruses as well as ORFV [13]. Currently, poxvirus vaccine manufacturers are focusing on virus growth in continuous cell lines [14]. Vero cells are the most commonly used cells for pox vaccine production [15]. However, these cells yield lower virus titers than primary cells [16] and pose a high risk of viral, fungal, and bacterial contamination [17], often produce irregular batches that are difficult to standardize, and have very limited capacity for passage or storage. *Capripoxvirus* members have been grown in OA3.Ts cells, an ovine testis cell line, but their titer was low, the growth was slow, and their pestivirus infection status was unclear [13]. Madin–Darby bovine kidney (MDBK) cells have also been evaluated for LSDV replication [18]; however, this cell line may not be free from bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection [19]. Embryonic sheep skin (ESH-L) cells are a diploid cell line that has been used successfully for detection and diagnosis of capripoxvirus infections. A comparative study has shown that ESH-L cells are less permissive to poxvirus infection than sheep embryonic heart (EH) cells. Despite this disadvantage, ESH-L cells were selected as the most appropriate alternative to primary cells because they can undergo multiple cell passages and exhibit long-term survival [16]. The aim of this study was to prepare and purify diploid cells derived from sheep EHs and test their utility for propagation of representative members of the genera *Parapoxvirus*, *Capripoxvirus*, and *Orthopoxvirus*.

Materials and methods

Preparation of sheep EH cells

Primary heart cells were obtained from three-month-old fetal lamb heart tissues. The tissues were first washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) containing a 5% antibiotic-antimycotic (AB-AM) solution and placed in a sterile Petri dish. They were then cut into small pieces, using a sterile scalpel and Mayo scissors, and enzymatically dissociated using 0.25% trypsin (Wisent Inc., cat. no. 325-042-CL) to obtain single cells. Erlenmeyer flasks containing cells were incubated at 31 °C with gentle agitation. Every 10 min, the supernatant was collected in a dedicated flask, and the number of viable cells in 100 µL of supernatant was determined using trypan blue (Wisent Inc., cat. no. 609-130-EL) before incubation. The cells were then cultured in BVDV-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Wisent Inc., cat. no. 219-015-XK) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in a 5% CO_2 environment and purified to isolate pure and homogeneous cell cultures. Briefly, the prepared primary EH cell suspension (2×10^6 cells/mL) was seeded into culture flasks and incubated at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO_2 for 6 h. After incubation, the culture medium containing non-adherent cells was discarded, and high-glucose DMEM supplemented with 10% FBS was added to continue purifying the cells. When the monolayer became confluent, the cells were subcultured continuously at 37 °C using only 5% FBS until the 40th passage (P40).

Evaluation of sheep EH cells

Cell morphology

P3 EH cells were Giemsa-stained to observe their morphology. Briefly, the cells were washed with PBS and fixed with ice-cold methanol for 10 min. They were then treated with May–Grünwald stain for 10 min, washed again with PBS, stained with diluted Giemsa stain (1/10) for 30 min, and washed again with PBS. The cytology and morphology of the stained cells were examined under a microscope.

Amplification and cryopreservation of sheep EH cells

Primary sheep EH cells were observed under an inverted microscope after incubation for 24 h. The medium was then replaced with fresh medium, and the cells were incubated further and examined daily. The cells were trypsinized and centrifuged at 2,656 × *g* and 4 °C for 10 min when the monolayers became confluent. The supernatant was discarded, and the cells were suspended in BVDV-free 70% DMEM supplemented with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, cat. no. D5879-1L) and 20% FBS (Wisent Inc., cat. no. 920-040) (cryopreservation medium). The total suspension was distributed in cryovials (1 mL per cryovial) and placed at -80 °C for 4 h and then in liquid nitrogen for cryopreservation until use. Cell viability was assessed after storage in liquid nitrogen for 1, 7, 30, 90, 180, 365, and 730 days. Three separate vials were thawed at each time point, and cell viability was evaluated using trypan blue and calculated using the following formula:

$$\%\ viable\ cells = \left[1.00 - (Number\ of\ blue\ cells \div Number\ of\ total\ cells)\right] \times 100$$

Growth kinetics and doubling time

Cellular growth kinetics were evaluated using six flasks seeded with 40,000 primary sheep EH cells per cm^2 and incubated at 37 °C with 5% CO_2. Every 24 h, one flask was

trypsinized, and the yield and doubling time were calculated as follows:

$$Cell\ doubling\ time\ (DT) = ln2/\mu$$

$$\mu = \ln X_n - \ln X_{n-1}/t_n - t_{n-1}$$

Where t is the time of trypsinization (hours) and X is the number of cells at time t. The assays were repeated three times, and the results were evaluated by different investigators.

Hayflick limit

Three 25-cm^2 flasks were seeded with 40,000 sheep EH cells per cm^2 and incubated at 37 °C with 5% CO_2 for 4 days. Then, the flasks were trypsinized separately and the yield was calculated. The cells were amplified and passaged until the yield was 90,000 cells/cm^2. The average of three yield calculations was determined.

Poxvirus propagation in sheep EH cells

Virus strains

Three viral strains were used in this study: the attenuated LSDV Neethling strain [20], CPV CMLV-T8 [21], and ORFV isolated from pathological material obtained from tissue sections of lip lesions in sheep from an infected flock.

Cells

Vero cells (African green monkey kidney, cat. no. CCL-81) and OA3.T cells (*Ovis aries* testis, cat. no. CRL-6546) were obtained from ATCC. Embryonic sheep skin (ESH-L) cells were obtained from FLI (cat. no. CCLV-RIE 0175). The cell lines were cultured in DMEM supplemented with 5% FBS for Vero cells and 10% FBS for OA3.T and ESH-L cells at 37 °C with 5% CO_2.

Primary lamb testis (LT) cells were obtained by castrating a healthy three-month-old male lamb and prepared using the protocol used for sheep EH cell preparation.

Permissivity of sheep EH cells to poxviruses

Four flasks were seeded with sheep EH cells at P5, P10, P15, P20, P25, P30, P35, and P40 (40,000 cells/cm^2). One flask was used as a control, and three other flasks were inoculated at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 with the attenuated LSDV Neethling strain, ORFV, or CPV.

Comparison of poxvirus propagation and adsorption on different cell lines

Three 25-cm^2 flasks were seeded with 40,000 primary sheep EH cells cells per cm^2, and three others were seeded with primary LT cells. After three days of incubation, the cells were inoculated at an MOI of 0.01 with the attenuated LSDV Neethling strain, ORFV, or CPV strain. The titers of LSDV, CPV, and ORFV were 6.3, 6.8, and 4.0 $\log_{10}TCID_{50}$/L, respectively. After 45 minutes of adsorption, the inoculated cells were incubated at 37 °C with 5% CO_2 and examined daily for a cytopathic effect (CPE) by three analysts. The viruses were harvested when the CPE was 80%. The control flasks were seeded at the same cell density for each cell line and left without virus infection.

Poxvirus adsorption

Four 25-cm^2 flasks were seeded with sheep EH and primary LT cells (two flasks per cell line). One flask containing each cell type was inoculated at an MOI of 0.01 with the attenuated LSDV Neethling strain. Uninfected cells were used as controls.

After adsorption for 45 min, the supernatant from the virus-inoculated cells was discarded, and virus adsorption on the surface of the two cell lines was evaluated using the immunoperoxidase assay (IPMA) reported by Haegeman et al. [22]. Briefly, after incubation for three days, the infected cells were fixed with 4% paraformaldehyde and methanol/30% H_2O_2, washed with PBS, and incubated with an in-house anti-sheeppox virus (SPPV) serum for 1 h. They were then incubated with peroxidase-conjugated anti-sheep IgG (Sigma Aldrich) for 1 h at 37 °C. After a final wash, the cells were incubated with 50 µL of substrate solution (3-amino-9-diethyl-carbazole in 50 mM sodium acetate buffer with 0.05% hydrogen peroxide) per well at room temperature for 15 min. The staining was stopped by removing the substrate and adding 100 µL of sodium acetate buffer, and the cells were observed under an inverted contrast microscope. Infected cells showed red staining.

Statistical analysis

Differences between virus titers and cell viability values were evaluated for significance using Fisher's exact test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.01$.

Results

Preparation of sheep embryonic heart cells

Figure 1 shows the development of a sheep EH cell monolayer. After five days of preparation, a few single cells

were observed (Fig. 1A). After 18 days, the monolayer had become confluent and was ready for trypsinization and amplification (Fig. 1D).

Evaluation of sheep embryonic heart cells

Cell morphology

Figure 2 shows the morphology of sheep EH cells. All of the cells exhibited the same morphology, confirming cell purification (Fig. 2B, C, and D). The cell bodies were cylindrical and irregular. Their cytoplasm was extensive and generally included 3-4 protuberances (Fig. 2E, F). The cell nuclei were oval, localized at the center of the cell body, and contained 2-3 visible nucleoli. Moreover, multiple cells adhered together to form sheet-like monolayers (Fig. 2A).

Viability after thawing

As shown in Figure 3, sheep EH cells remained viable after cryopreservation in liquid nitrogen for one year, confirming their ability to be preserved and stored. The viability was >81% after freezing for 24 h to 1 month, and 81% after freezing for one year.

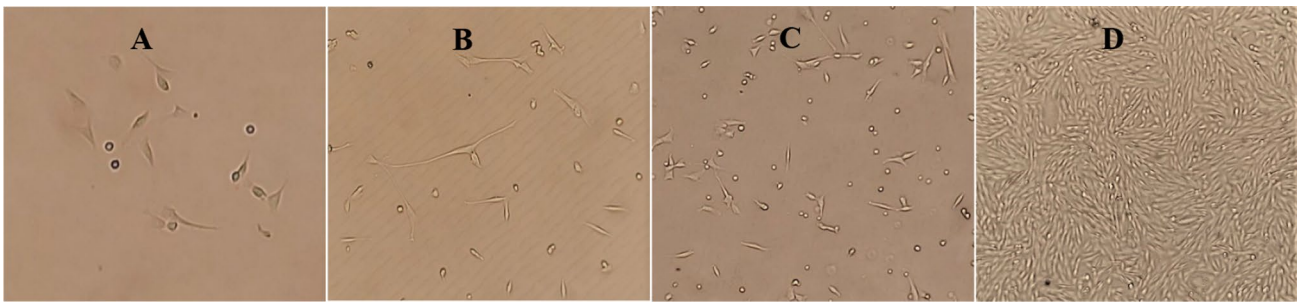


Fig. 1 Sheep embryonic heart cells on (A) day 5 (100×), (B) day 8 (40×), (C) day 12 (40×), and (D) day 18 (40×) after preparation and purification

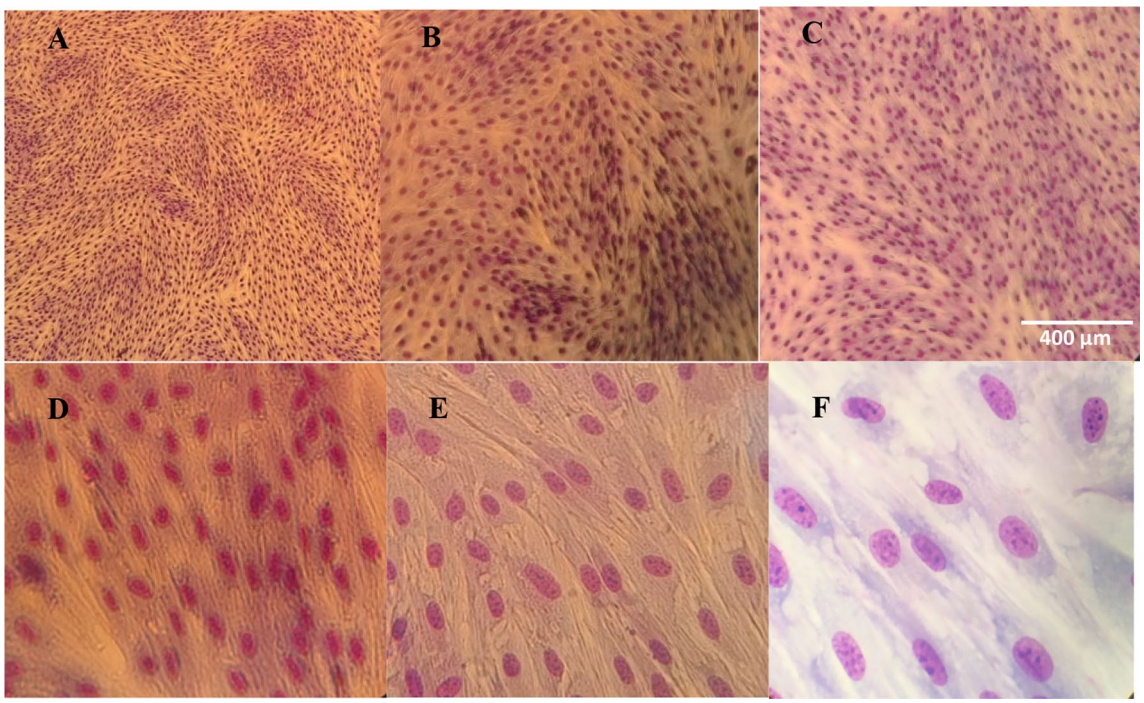


Fig. 2 Morphological identification of sheep embryonic heart cells by Grunwald–Giemsa staining. (A) 40×, (B) 100×, (C) 200×, (D) 400×, (E) 600×, (F) 1000×

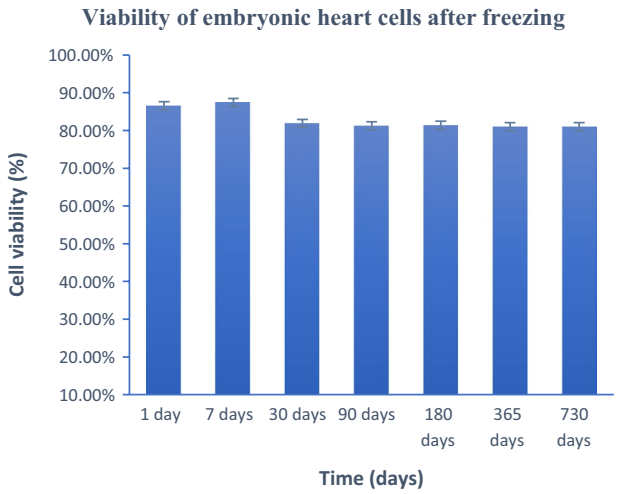


Fig. 3 Viability of sheep embryonic heart cells after varying periods of cryopreservation in liquid nitrogen

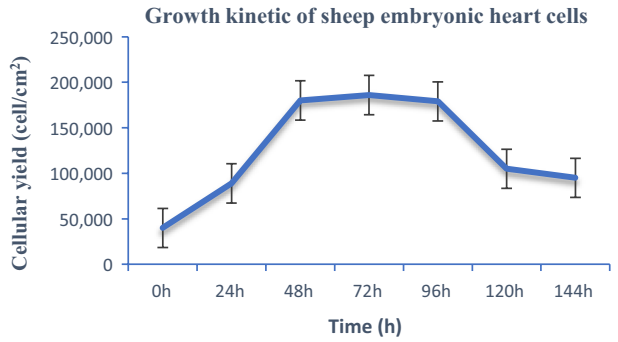


Fig. 4 Growth kinetic of sheep embryonic heart cells

Cell growth kinetics

A sheep EH cell monolayer with an initial density of 40,000 cells/cm^2 became confluent 72 h after seeding, with maximum cellular yield of 186,000 cells per cm^2. The cell density remained stable after further incubation for 24 h (96 h post-seeding) and then gradually decreased to 95,000 cells/cm^2 at 144 h post-seeding (Fig. 4).

Cell yield after 40 passages

The yield of sheep EH cells at P40 was 87,000 cells/cm^2. From P1 to P20, it was between 180,000 and 150,000 cells/cm^2, and from P21 to P38, it was between 145,000 and 100,000 cell/cm^2 (Fig. 5).

Comparison of different cell lines

Table 1 shows a comparison of the properties of sheep EH, ESH-L, and primary LT cells. The EH, ESH-L, and primary LT cell monolayers become confluent in 72, 80, and 96 h, with cell doubling in 24, 26, and 32 h, respectively, and a maximum of 45, 40, and 14 cell passages, respectively.

Susceptibility of sheep embryonic heart cells to viral infection

Poxvirus production in sheep EH cells after 40 passages

Figure 6 shows the CPE caused by LSDV (Fig. 6C), CPV (Fig. 6B), and ORFV (Fig. 6A). Unlike the control culture (Fig. 6D), intracytoplasmic inclusion bodies, syncytia, and intranuclear inclusion bodies were observed in LSDV-infected cell culture. At the advanced stages of virus propagation, the monolayer was destroyed and the infected cells rounded up and detached from the surface. CPV produced multinucleated giant cells, multinucleated syncytia, and small holes in cell sheets due to the detachment of multinucleated cells. ORFV included degenerative changes in cells that caused rounding, nuclear vacuolation, chromatin fragmentation, loss of cell monolayer continuity, and intracytoplasmic inclusion bodies (Table 2).

The data for poxvirus propagation in sheep EH cells are shown in Table 3. The results were statistically validated by performing three replicates ($p > 0.01$). As the passage number increased, virus replication gradually decreased; however, LSDV and ORFV replication was not significantly different from P5 to P20 and P5 to P15, respectively (6.8 and 7.4 $\log_{10}$TCID$_{50}$/mL, respectively). The CPV titers were stable from passages 1 to 15 (7.6 $\log_{10}$TCID$_{50}$/mL).

Comparison of the poxvirus sensitivity of different cell lines

The data for poxvirus propagation in EH, primary LT, ESH-L, OA3.Ts, and Vero cells are shown in Table 3. The results were validated statistically by performing three repetitions ($p > 0.01$). The titers obtained using sheep EH cells and ESH-L cells (>7 $\log_{10}$TCID$_{50}$/mL) were substantially different from those obtained using other cells (<7 $\log_{10}$TCID$_{50}$/mL). Nevertheless, virus replication continued for a longer time in primary LT cells than in Vero cells and OA3.Ts, with significantly lower titers, which is explained by the longer time until CPE was observed and 80% CPE was reached. The sensitivity of ESH-L and EH cells to LSDV and ORFV was similar, with a 0.6 log higher value for CPE/EH than for CPE/ESH-L. In addition, the time until CPE was observed and the time until 80% CPE was reached were similar.

Comparison of poxvirus adsorption on embryonic heart cells and primary lamb testis cells

Figure 7 shows LSDV adsorption on sheep EH and primary LT cells using the IPMA assay. The control cells (Fig. 7A



Fig. 5 Sheep embryonic heart cell yield after 40 passages

Table 1 Cellular proprities of EH, ESH-L, and LT cells

Cells	Cell doubling time (h)	Confluent monolayer formation time (h)	Maximum passage no.
EH	24 ± 0.6	72	45 (56,000 cell/cm^2)
ESH-L	26 ± 0.66	80	40 (50,000 cell/cm^2)
LT	32	96	14 50,000 cell/cm^2)

and D) did not show specific staining, and the control monolayers were clearer than the infected monolayers. Moreover, the infected EH cells (Fig. 7B) showed more-intense staining than the infected primary LT cells (Fig. 7C).

Discussion

The production of a viral vaccine requires the optimization of three integrated stages: upstream (selecting the appropriate producer cell culture and defining the optimal growth conditions) and downstream processing, isolation, and purification [23]. Upstream and downstream processing are considered the most critical steps, because they determine the maximum number of virus particles that can be produced. Primary cells are most commonly used for LSDV vaccine production; however, their use has several disadvantages, limited passage ability, tedious preparation processes, and the inability to cryopreserve these cells in liquid nitrogen. Most cell lines in current use were developed in the 1960s

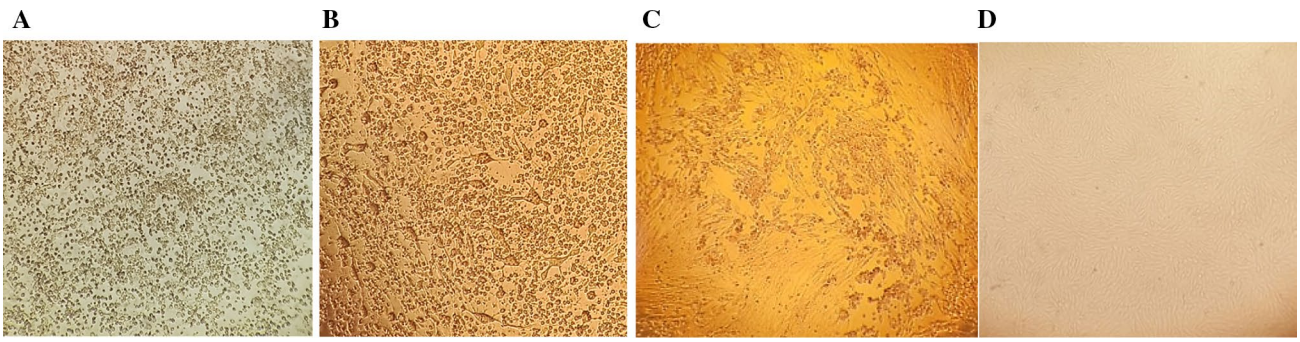


Fig. 6 The cytopathic effect (CPE) of (A) orf virus, (B) camelpox virus, and (C) lumpy skin disease virus (LSDV) on sheep embryonic heart cells. (D) Uninfected control. Magnification: 200×

Table 2 Poxvirus titers in sheep embryonic heart cells on 40 passages

Cell passage	Titer ($log_{10}TCID_{50}$/mL)		
	LSDV	CPV	ORFV
1–5	7.0	7.6	7.6
10	6.8	7.6	7.4
15	6.8	7.6	7.4
20	6.8	6.8	7.2
25	6.6	6.8	6.8
30	6.2	6.6	6.4
35	5.9	6.0	5.9
40	5.4	5.8	5.6

Data are expressed as the mean ± S.D. (n = 3). CPV, camelpox virus; LSDV, lumpy skin disease virus; ORFV, orf virus

Table 3 Poxvirus titers in sheep embryonic heart (EH) cells, primary lamb testis (LT) cells, embryonic sheep skin (ESH-L) cells, OA3.Ts cells, and Vero cells

	Cells	LSDV	CPV	ORF
Time until CPE observed (h)	EH	48	24	36
	ESH-L	48	24	36
	LT	60	48	54
	Vero	72	30	48
	OA3.Ts	96	96	72
Time to reach 80% CPE (h)	EH	84	60	72
	ESH-L	84	60	72
	LT	108	72	96
	Vero	120	60	96
	OA3.Ts	144	120	120
Virus titer at 80% CPE ($log_{10}TCID_{50}$/mL)	EH	7.0 ± 0.05	7.6 ± 0.01	7.4 ± 0.05
	ESH-L	7.0 ± 0.05	7.0 ± 0.1	7.4 ± 0.05
	LT	6.8 ± 0.1	6.9 ± 0.1	6.2 ± 0.05
	Vero	4.8 ± 0.05	6.0 ± 0.01	5.6 ± 0.10
	OA3.Ts	4.6 ± 0.10	4.6 ± 0.05	5.6 ± 0.05

Statistically significant differences in different repetitions of passaged cells are indicated by $P \leq 0.05$. CPE, cytopathic effect; CPV, camelpox virus; LSDV, lumpy skin disease virus; ORFV, orf virus

and 1970s. Established animal cell lines, such as Vero, MDCK, and chicken embryo fibroblasts (CEFs), remain the main cell lines used for viral vaccine production [24]. However, an LSDV vaccine produced in Vero cells was shown to have insufficient immunogenicity in animals [25]. Interestingly, CMP vaccines produced in Vero cells are potent and safe and control the disease, even at a concentration of 5.5 log_{10} $TCID_{50}$/mL [26]. These cells have been used for adaptation of ORFV to cell culture [27]. CEFs have been used to prepare an experimental vaccine against ORFV; however, the virus titer was low (4.2 log_{10} $TCID_{50}$/mL) [28].

In this study, we focused on the development of diploid cells from sheep fetus hearts, which have the advantages of continuous cell lines, such as high cell passage capacity, cryopreservation in liquid nitrogen, and repeatability among batches, as well as those of primary cells, such as the ability to produce a large number of poxvirus particles. Recently, FBS production methods have been investigated due to animal welfare concerns. FBS is harvested from bovine fetuses obtained from pregnant cows during slaughter [29]. The most common method of fetus harvesting involves cardiac puncture without anesthesia. This practice of harvesting FBS is inhumane, as it exposes the fetus to pain and/or discomfort [30]. Efforts are currently being made to reduce FBS use and replace it with synthetic alternatives [31]. Sheep EH cells can be grown in medium containing only 5% FBS, which is not possible for primary cells.

The viability of isolated cells was tested after cryopreservation in liquid nitrogen, and 80% of the cells remained viable two years after conservation, which means that a single cell preparation can be used for more than a year for virus production. Sheep EH cells were found to have a doubling time of 24 h, and the monolayer became confluent after only 72 h. Thus, the cells can be manipulated twice per week, which is favorable for quick production. The generation of a growth curve can be useful for evaluating the growth characteristics of a cell line. The lag phase, which is the initial growth phase after subculture and re-seeding, during which the cell population takes time to recover, is approximately

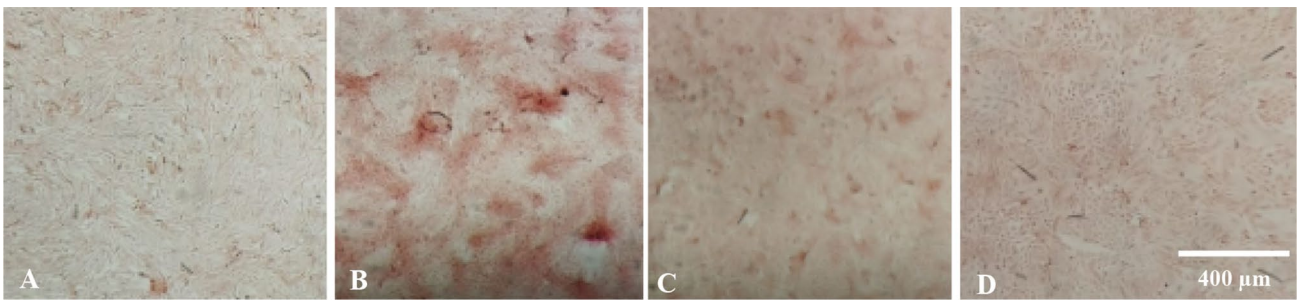


Fig. 7 Immunoperoxidase-stained sheep embryonic cells heart (A and B) and primary lamb testis cells (C and D) without infection (A and C) or after infection with LSDV (B and D). Magnification: 100×

24 h. The number of cells remained relatively constant prior to the onset of rapid growth. During the lag phase, the cell replaces the glycocalyx elements lost during trypsinization, attaches to the substrate, and spreads out, and the cytoskeleton reappears [32]. The log phase occurs between 24 and 72 h after seeding. This is a period of exponential increase in cell number due to continuous division. The length of the log phase depends on the initial seeding density, the cell growth rate, and the density at which cell proliferation is inhibited. This phase is the most reproducible, as the fraction of viable cells is high and the population is uniform [33]. The stationary phase occurs between 72 and 96 h after seeding, when the culture becomes confluent at the end of the log phase. The growth rate decreases during this phase, and cell proliferation ceases, in some cases due to exhaustion. The cells are in contact with the surrounding cells and the entire growth surface is occupied. At this stage, the fraction of growing cells falls to between 0% and 10% [34]. Wang et al. reported that bovine Sertoli cells grew to a confluent monolayer in 72 h, and P3 cells were able to undergo 20 passages [35]. In our study, the cell yield was measured for 45 passages, and a steady decline was observed ($R^2 > 0.9$) throughout the experiment, indicating a strong correlation between passage number and decreased yield. The results confirmed that cell division decreased at P38, P39, and P40 after reaching the Hayflick limit. Hayflick showed that a cell can complete mitosis or cellular duplication and division only 40-60 times before undergoing apoptosis [36]. This conclusion holds for many cell types, both adult and fetal. There appears to be a correlation between the maximum number of passages and aging, with repeated mitosis leading to shortening of the telomeres on the DNA of the cell [37]. Julian et al. [38] suggested that cellular damage could result from the cells being in an environment that differs from their original environment or being handled in the laboratory [38, 39].

Virus testing is the second step in cell characterization, where the cell substrate should be designed to detect several viruses. Appropriate screening tests should be performed based on the cultivation history of the cell line. The development of a characteristic CPE provides an early indication of virus propagation. In this study, each of the three poxviruses tested produced specific CPE with distinguishable characteristics. Poxviruses have a large double-stranded DNA genome that allows them to encode their own machinery for genome replication and undergo intracytoplasmic replication. ORFV and LSDV produce intracytoplasmic inclusion bodies and cause continuity loss in the cell monolayer, producing multinucleated syncytia and detachment of multinucleated cells. After determining that these cells were permissive to poxvirus infection, we tested each cell passage for sensitivity to infection. Knowing the highest passage number that can be productively infected is important for assessing the feasibility of their application on an industrial scale. Our results showed no significant difference in ORFV replication from P5 to P15 (7.4 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL). The titers of LSDV and CPV were stable from P5 to P20 (6.8 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL) and P1 to P15 (7.6 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL). We concluded that P1-P20 and P20-P45 cells could be used for vaccine production and laboratory use, respectively. Nevertheless, all viral titers obtained at P35 were higher than those obtained in Vero cells. Moreover, the viral titers for primary LT cells were substantial, but always lower than those for sheep EH cells (6.2 vs. 7.4 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL for ORFV, 6.8 vs. 7.0 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL for LSDV, and 6.0 vs. 7.6 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL for CPV). In addition to producing a lower virus titer, primary LT cells can only be used until P5, which is inconvenient for virus production. In 2021, LSDV was produced using primary LT cells in a CelCradle™ -500A bioreactor, which has many advantages, but the titers were comparable with those obtained using a conventional system, and the process still needs to be optimized. Our preliminary results suggest that the cell substrate in that system can be replaced with sheep EH cells [40].

ESH-L cells have also been validated for capripoxvirus propagation and diagnosis. Rhazi et al. confirmed that the LSDV titers in ESH-L and heart cells were similar, but SPPV and goatpox virus (GTPV) titers in ESH-L cells were lower than those in heart cells [16]. Moreover, ESH-L cells can be used to develop an immunoenzymatic quantitative method for detecting sheep poxvirus antibodies, which suggests that sheep EH cells might be applicable for poxvirus diagnosis [39]. In this study, the EH cells were compared with Vero cells and OA3.Ts cells, which are used for poxvirus detection and replication, and found to be highly sensitive to virus infection, with rapid onset of CPE and a short time until reaching 80% CPE.

The viral life cycle is divided into adsorption, penetration, uncoating, viral genome replication, maturation, and release stages. To understand the high permissivity of sheep EH cells, we immunostained the cells before and after virus adsorption and used infected LT and uninfected sheep EH cells as positive and negative controls, respectively. Infected sheep EH cells showed stronger staining than infected primary LT cells. In future studies, it should be confirmed, using specific markers, that sheep EH cells have specific type-1 membrane glycoprotein receptors for poxviruses. Stages of the viral life cycle should also be examined.

Conclusion

The use of sheep EH cells for poxvirus culture provides the advantages of homogenous virus production and titer stability. In addition, using sheep EH cells may simplify production and diagnosis processes, reduce production time and

cost, and guarantee batch repeatability. It may also lessen the risk of contamination with other pathogens during viral culture. These observations have great practical significance for industrial and large-scale applications.

Author contributions All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection, and analysis were performed by HR, MA, IT, and OB. The first draft of the manuscript was written by HR and revised by ME, KM, ML, NS, and KOT. All authors read and approved the final manuscript.

Funding The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this article.

Data availability The data are available on request from the authors.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Ethics and consent to participate Animal experiments were performed in accordance with the international guidelines for the care and handling of experimental animals described in the Terrestrial Animal Health Code and Directive 2010/63/UE of the European Commission. The protocol was approved by the Internal Ethics Committee for Animal Experiments at the MCI Santé Animale.

References

1. Ayelet G, Haftu R, Jemberie S, Belay A, Gelaye E, Sibhat B, Skjerve E, Asmare K (2014) Lumpy skin disease in cattle in central Ethiopia: outbreak investigation and isolation and molecular detection of the virus. Rev Sci Tech 33(3):877–887. https://doi.org/10.20506/rst.33.3.2325. (**PMID: 25812211**)
2. Mosadeghhesari M, Oryan A, Zibaee S, Varshovi HR (2014) Molecular investigation and cultivation of camelpox virus in Iran. Arch Virol 159(11):3005–3011. https://doi.org/10.1007/s00705-014-2169-1. (**Epub 2014 Jul 10; PMID: 25008899**)
3. Kriz B (1982) A study of camelpox in Somalia. J Comp Pathol 92(1):1–8. https://doi.org/10.1016/0021-9975(82)90037-8. (**PMID: 6279703**)
4. Kinne J, Cooper JE, Wernery U (1998) Pathological studies on camelpox lesions of the respiratory system in the United Arab Emirates (UAE). J Comp Pathol 118(4):257–266. https://doi.org/10.1016/s0021-9975(07)80002-8. (**PMID: 9651803**)
5. Yuan L, Hensley C, Mahsoub HM, Ramesh AK, Zhou P (2020) Microbiota in viral infection and disease in humans and farm animals. Prog Mol Biol Transl Sci. 171:15–60. https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.04.005. (**Epub 2020 Apr 24; PMID: 32475521; PMCID: PMC7181997**)
6. Underwood WJ, Blauwiekel R, Delano ML, Gillesby R, Mischler SA, Schoell A (2015) Chapter 15. Biology and diseases of ruminants (sheep, goats, and cattle), 3rd edn. Elsevier Inc., Amsterdam (**ISBN 9780124095274**)
7. Hess RD, Weber F, Watson K, Schmitt S (2012) Regulatory, biosafety and safety challenges for novel cells as substrates for human vaccines. Vaccine 30:2715–2727. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.015
8. El Ansary RE, El Dabae WH, Bream AS, El Wakil A (2022) Isolation and molecular characterization of lumpy skin disease virus from hard ticks, Rhipicephalus (Boophilus) annulatus in Egypt. BMC Vet Res. https://doi.org/10.1186/s12917-022-03398-y
9. El-Nahas E, El-Habbaa A, El-bagoury G, Radwan M (2011) Isolation and identification of lumpy skin disease virus from naturally infected buffaloes at Kaluobia. Egypt Glob Veter 7:234–237
10. Falluji MM, Tantawi HH, Shony MO (1979) Isolation, identification and characterization of camelpox virus in Iraq. J Hyg (Lond) 83(2):267–272. https://doi.org/10.1017/s002217240002605x. (**PMID:226624; PMCID:PMC2129903**)
11. Abdelhamed AM, Ghazy A (2015) Antivirals and antiretrovirals isolation and molecular diagnosis of orf virus from small ruminants and human in Egypt. J Antivirals Antiretrovirals. https://doi.org/10.4172/jaa.1000113
12. Huda AMA, Hussein AMA (2014) Isolation of orf virus (ORFV) from Iraqi sheep and study the pathological changes in mice. Int J Curr Microbiol Appl Sci 3:743–747. http://www.ijcmas.com
13. Babiuk S, Parkyn G, Copps J, Larence JE, Sabara MI, Bowden TR, Boyle DB, Kitching RP (2007) Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. J Vet Diagn Investig 19(5):486–491. https://doi.org/10.1177/104063870701900505. (**PMID: 17823391**)
14. Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK (2009) Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. Expert Rev Vaccines 8(5):607–618. https://doi.org/10.1586/erv.09.19. (**PMID: 19397417**)
15. Duraffour S, Meyer H, Andrei G, Snoeck R (2011) Camelpox virus. Antiviral Res 92(2):167–186. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.09.003. (**Epub 2011; PMID: 21945248**)
16. Rhazi H, Safini N, Mikou K, Alhyane M, Lenk M (2021) Comparative sensitivity study of primary cells, vero, OA3.Ts and ESH-L cell lines to lumpy skin disease, sheeppox, and goatpox viruses detection and growth. J Virol Methods 293:114164. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114164
17. Babiuk S, Bowden TR, Boyle DB, Wallace DB, Kitching RP (2008) Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. Transbound Emerg Dis 55(7):263–272. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2008.01043.x. (**PMID: 18774991**)
18. Fay PC, Cook CG, Wijesiriwardana N, Tore G, Comtet L, Carpentier A, Shih B, Freimanis G, Haga IR, Beard PM (2020) Madin–Darby Bovine Kidney (MDBK) cells are a suitable cell line for the propagation and study of the bovine poxvirus lumpy skin disease virus. J Virol Methods 285:113943. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113943
19. Uzar S, Sarac F, Gulyaz V, Enul H, Yılmaz H, Turan N (2022) Comparison and efficacy of two different sheep pox vaccines prepared from the Bakırköy strain against lumpy skin disease in cattle. Clin Exp Vaccine Res. 11(1):1–11. https://doi.org/10.7774/cevr.2022.11.1.1. (**Epub 2022 Jan 31; PMID: 35223661; PMCID: PMC8844671**)
20. Capstick PB, Coackley W (1961) Protection of cattle against lumpy skin disease: I—trials with a vaccine against neethling type infection. Res Vet Sci 2(4):362–368. https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)34940-3. (**ISSN 0034-5288**)
21. El Harrak M, Loutfi C (2000) La variole du dromadaire chez le jeune au Maroc. Isolement et identification du virus. Mise au point du vaccin et application à la prophylaxie. Revue Elev Med Vet Pays Trop 53:165–167
22. Haegeman A et al (2020) An immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) for the detection of lumpy skin disease antibodies. J Virol Methods 277:113800. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113800
23. Morenweiser R (2005) Downstream processing of viral vectors and vaccines. Gene Ther 12(Suppl 1):S103–S110. https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302624. (**PMID: 16231042**)

24. Genzel Y (2015) Designing cell lines for viral vaccine production: where do we stand? Biotechnol J 10(5):728–740. https://doi.org/10.1002/biot.201400388. (**Epub 2015 Apr 22; PMID: 25903999**)
25. Gari G, Abie G, Gizaw D, Wubete A, Kidane M, Asgedom H, Bayissa B, Ayelet G, Oura CAL, Roger F et al (2015) Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus. Vaccine 33:3256–3261. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.035
26. Abdellatif MM, Ibrahim AA, Khalafalla AI (2014) Development and evaluation of a live attenuated camelpox vaccine from a local field isolate of the virus. Rev Sci Tech 33(3):831–838. https://doi.org/10.20506/rst.33.3.2321. (**PMID: 25812207**)
27. Hussain KA, Burger D (1989) In vivo and in vitro characteristics of contagious ecthyma virus isolates: host response mechanism. Vet Microbiol 19(1):23–36. https://doi.org/10.1016/0378-1135(89)90088-6. (**PMID: 2466365**)
28. Mercante MT, Lelli R, Ronchi GF, Pini A (2008) Production and efficacy of an attenuated live vaccine against contagious ovine ecthyma. Vet Ital 44(3):537–542, 543–547 **(English, Italian, PMID: 20405450)**
29. Nielsen OB, Hawkes P (2019) Fetal bovine serum and the slaughter of pregnant cows: animal welfare and ethics. BioProcess J 1–4. (**ID: 81148229**)
30. Jochems CE, van der Valk JB, Stafleu FR, Baumans V (2002) The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? Altern Lab Anim 30(2):219–227. https://doi.org/10.1177/026119290203000208. (**PMID: 11971757**)
31. Gstraunthaler G (2003) Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. Altex 20(4):275–281 (**PMID: 14671707**)
32. Toloudi M, Ioannou E, Chatziioannou M, Apostolou P, Kiritsis C, Manta S, Komiotis D, Papasotiriou I (2014) Comparison of the growth curves of cancer cells and cancer stem cells. Curr Stem Cell Res Ther 9(2):112–116. https://doi.org/10.2174/1574888x09666140121163539. (**PMID: 24359142**)
33. Seewöster T, Lehmann J (1997) Cell size distribution as a parameter for the predetermination of exponential growth during repeated batch cultivation of CHO cells. Biotechnol Bioeng 55(5):793–797. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5%3c793::AID-BIT9%3e3.0.CO;2-6. (**PMID: 18636589**)
34. Verma A, Verma M, Singh A (2020) Chapter 14—animal tissue culture principles and applications, animal biotechnology, 2nd edn. Academic Press, New York, pp 269–293. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4.35 (**ISBN 9780128117101**)
35. Wang G, Wang Y, Kong J, Li Y, Wu J, Chen Y, Liu X, Shang Y, Zhang Z (2019) Comparison of the sensitivity of three cell cultures to ORFV. BMC Vet Res 15(1):13. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1760-1. (**PMID:30616567; PMCID:PMC6322270**)
36. Hayflick L (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp Cell Res 37:614–636. https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9. (**PMID: 14315085**)
37. Jiang Y, Zheng W (2019) Cell damage and transformation in aging. In: Gu D, Dupre M (eds) Encyclopedia of gerontology and population aging. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69892-2_434-1
38. Shay JW, Wright WE (2019) Telomeres and telomerase: three decades of progress. Nat Rev Genet 20(5):299–309. https://doi.org/10.1038/s41576-019-0099-1. (**PMID: 30760854**)
39. Rhazi H, Mikou K, Sadeqy Y, Alhayane M, ElMejdoub S, Safini N, Lenk M, Tadlaoui KO, Elharrak M (2022) Evaluation of ELISA and VNT for sheeppox virus antibody detection and development of an immunoenzymatic quantitative method. J Immunol Methods 502:113226. https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113226. (**Epub 2022 Jan 13; PMID: 35032520**)
40. Rhazi H, Safini N, Mikou K, Alhyane M, Tadlaoui KO, Lin X, Venkatesan NP, Elharrak M (2021) Production of small ruminant morbillivirus, rift valley fever virus and lumpy skin disease virus in CelCradle™ -500A bioreactors. BMC Vet Res 17(1):93. https://doi.org/10.1186/s12917-021-02801-4. (**PMID:33639955; PMCID:PMC7913422**)

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Chapitre II : Amélioration du processus de production de l'antigène des Capripoxvirus

Ce chapitre est divisé en deux parties :

1. Optimisation du système de production de l'antigène des Capripoxvirus

Cette partie de la thèse a donné lieu à une publication, dans le journal **BMC Veterinary Research**

Production of small ruminant morbillivirus, rift valley fever virus and lumpy skin disease virus in CelCradle™ -500A bioreactors

Doi: https://doi.org/10.1186/s12917-021-02801-4

2. Effet des phytohormones sur la qualité du milieu de culture cellulaire

Cette partie de la thèse a donné lieu à une publication soumise.

Chapitre II : Amélioration du processus de production de l'antigène des Capripoxvirus

La sélection des cellules optimales pour l'isolement et production virale des CaPVs est une étape primordiale pour l'amélioration et le développement des vaccins contre ces virus ; cependant, d'autres facteurs influencent ce processus, l'impact de ces facteurs est souvent direct sur la croissance cellulaire et indirect sur la propagation virale.

Le système de production joue un rôle primordial au cours de la fabrication des vaccins ; plus le système est adaptable, facile à manipuler et similaire à l'environnement cellulaire naturel plus la croissance cellulaire est élevée et le titre viral est maximal. En outre, le milieu de culture des cellules est utilisé pour imiter les conditions physiologiques *in vivo*, par conséquent son optimisation pour un type défini des cellules est importante pendant la culture cellulaire et virale.

L'objectif de ce chapitre est :

- Etudier un système innovant 3D alternatif aux systèmes conventionnels pour la production des antigènes CaPVs.
- Définir l'impact d'ajout des phytohormones dans le milieu de culture cellulaire sur le rendement et le comportement cellulaire des cellules utilisées pour la multiplication des CaPVs.

1. Optimisation du système de production de l'antigène des Capripoxvirus

Les vaccins vétérinaires viraux sont généralement cultivés sur des cellules adhérentes et moins fréquemment sur des cellules en suspension. Ces cellules adhérentes, telles que les cellules Vero, sont fréquemment cultivées sur des systèmes conventionnels tels que les rollers et Cell Factories. Mais, tous ces systèmes comportent des opérations compliquées et offrent de faibles densités cellulaires. De plus, ils sont longs et exigent des opérations lourdes telles que la préparation des montages pour l'amplification cellulaire et l'inoculation virale. Les microporteurs tels que cytodex ont également été largement utilisés pour la culture des cellules. Ces systèmes offrent un meilleur transfert d'oxygène ; mais ils se traduisent souvent par de faibles densités cellulaires en raison de l'accumulation de métabolites toxiques et la contrainte de cisaillement.

A côté de ces systèmes de culture cellulaire, d'autres systèmes existent tels que les bioréacteurs. En général, les bioréacteurs présentent les avantages d'un bon mélange de l'aération et des nutriments, mais nécessitent un système d'oxygénation extérieur et donc des techniques d'utilisation sophistiquées. Un nouveau bioréacteur à usage unique - le CelCradle™ -500A a été

évalué dans la présente étude pour la culture de cellules adhérentes dans le but de cultiver des virus utilisés dans la production de vaccins contre un certain nombre de maladies virales vétérinaires.

Le CelCradle™-500A est un bioréacteur à usage unique capable de produire des cultures cellulaires à haute densité pour la production de vaccins, de protéines recombinantes et d'anticorps monoclonaux. Le bioréacteur utilisé dans cette étude se compose de deux compartiments ; une chambre supérieure en polyéthylène téréphtalate contenant 5,5 g de macroporteurs qui fournissent les matrices pour l'adhérence et la croissance cellulaire et une chambre inférieure compressible (LCC) en polyéthylène basse densité contenant le milieu. Le bouchon est équipé d'un filtre PTFE de 0,22 μm. Le CelCradle est muni d'une unité de contrôle pour le réglage des paramètres de culture. Le mouvement ascendant et descendant des milieux de culture permet aux cellules de recevoir un cycle alterné d'aération et de nutrition.

Les cellules utilisées dans ces études sont les cellules Vero et les cellules primaires de testicule d'agneau (LT). Les cellules Vero ont été achetées de l'ATCC (n° CCL-81) et initialement cultivées dans 1, 3 ou 5 % de milieu DMEM contenant du sérum bovin fœtal (FBS) dans le but de sélectionner les conditions optimales de culture cellulaire et de production de virus. Les cellules primaires LT ont été obtenues par castration d'un mâle sain âgé de 3 mois et obtention de cellules de testicule. Les cellules ont été préparées et propagées dans le milieu d'Eagle modifié de Dulbecco additionné de 10% de FBS. Les macroporteurs ont été équilibrés dans 400 ml de milieu. Après cela, 100 ml des cellules respectives ont été ajoutés dans des bioréacteurs CelCradle™-500A individuels. La période d'ensemencement et de fixation des cellules était de 3 h. Après cette période d'incubation, 2 macroporteurs ont été prélevés à l'aide de pinces stériles, fixés avec 2 ml d'éthanol à 95 %, colorés avec 2 ml de bleu trypan, et observés au microscope pour visualiser l'attachement cellulaire. Quand l'attachement cellulaire est supérieur à 90 %, les paramètres de mouvement de la marée ont été remplacés par les paramètres de la culture cellulaire.

La densité cellulaire portée par les macroporteurs a également été évaluée par une méthode de coloration du noyau au colorant cristal violet (CVD) avec 2 macroporteurs prélevés dans la bouteille. Les porteurs ont été incubés à 37°C avec 1 ml de CVD et vortexés toutes les 15 min. Un hémocytomètre a ensuite été utilisé pour compter les noyaux pour l'évaluation du nombre de cellules. Le temps de doublement cellulaire a été calculé avec la formule suivante: Temps de doublement

cellulaire (DT) = ln2/μ, Où μ = ln Xn - ln Xn-1 /tn-tn-1, t : moment du prélèvement (heures), X : nombre de cellules à t (cellules/bouteille).

Les expériences ont été exécutées en 2 phases pour optimiser la croissance cellulaire et la culture virale. Initialement, la cinétique de croissance cellulaire a été étudiée pour les cellules Vero. Les concentrations optimales de FBS pour la culture de cellules Vero ont été déterminées en utilisant 1, 3 et 5 % de sérum dans le milieu. Le milieu optimal était alors utilisé pour des expériences ultérieures de propagation de virus.

Pour la phase 1, la concentration des cellules d'ensemencement pour les cellules Vero était de $11,36 \times 10^3$ cellules/cm^2 pour chacun des 3 types de milieu. Dans la phase 2 de la production de virus, l'ensemencement cellulaire était de $22,72 \times 10^3$ cellules/cm^2. Pour les cellules LT, la concentration cellulaire utilisée était de $1,7 \times 10^3$ cellules/cm^2. Pour la phase de production de virus, l'ensemencement cellulaire des cellules LT était de $2,77 \times 10^3$ cm^2. En parallèle, en comparaison directe, des Cell Factories (CF, chambre Nunc 10) d'une surface totale de 6320 cm^2, ont été ensemencés avec $3,99 \times 10^4$ cellules/cm^2 de cellules LT et Vero.

Dans la partie virale trois souches vaccinales atténuées ont été utilisées dans cette étude : la souche PPRV Nigeria 75, le virus RVF Clone 13T et le virus LSD souche Neethling. Le milieu de culture dans chacune des 3 bouteilles CelCradle a été remplacé par 300 ml de DMEM contenant 1% de FBS. Les cellules étaient inoculées avec des virus à un MOI de 0,01 au jour 4 pour la PPR et la RVF et au jour 5 pour le virus LSD, déjà adapté aux cellules respectives. Les titres des virus ensemencés étaient de 6,2 (log10TCID50/ml) pour la PPR, 7,5 ($log10TCID_{50}$/ml) pour la RVF et 6,3 ($log10TCID_{50}$/ml) pour le LSD.

Deux prélèvements des macroporteurs ont été effectués quotidiennement jusqu'au 10ème jour après l'infection afin de déterminer la cinétique de croissance du virus. Deux millilitres du milieu de culture surnageant contenant le virus sécrété, le virus extracellulaire, ont été obtenus à chaque prélèvement et conservés à +4°C. Deux macroporteurs ont également été échantillonnés pour le virus intracellulaire et stockés à -20°C jusqu'au titrage.

Le virus intracellulaire a été obtenu par la lyse des cellules par un cycle de congélation/décongélation. Pour le titrage de virus, des cellules Vero/LT ont été ensemencées à une densité de 110 000 cellules/puits et (100 μl) de virus dilué en série ont été ajoutés à chaque puits. Après une période d'incubation de 96 h à 37°C, le titre du virus a été déterminé par dosage IPMA.

Pour réduire le pourcentage de sérum dans le milieu de croissance pour la culture de cellules Vero, les cellules ont été cultivées dans du DMEM avec différents pourcentages de FBS (1,3 et 5%). La fixation cellulaire la plus importante a été obtenue dans un milieu FBS à 1 % avec un total de 2,3 × 10^8 cellules/bouteille après 3 h d'incubation. La cinétique de croissance cellulaire a été évaluée pour les 2 types de cellules en utilisant le système conventionnel et le système CelCradle™-500.

La croissance des cellules Vero a été augmentée de 19 fois par rapport à la concentration d'ensemencement, ce qui a engendré une diminution du temps de doublement qui était de 24 h dans le système CF. Sur le système CelCradle™ -500A, nous avons obtenu un DT de 28 h.

Les cellules LT ont été cultivées dans le CelCradle™-500A jusqu'à un nombre total de 6,7 × 10^8 cellules/bouteille obtenu après 8 jours de culture. Le CelCradle a permis une croissance cellulaire plus élevée que le CF. De plus il a été observé que dans le CF le nombre des cellules après 6 jours de culture a chuté de façon drastique et a montré une forte diminution de la viabilité.

Dans ce travail, nous avons étudié la cinétique de trois virus (PPR, RVF et LSD) sur deux systèmes de production différents. Les titres viraux obtenus étaient similaires dans les deux systèmes pour les virus PPR et RVF. En ce qui concerne le virus LSD, le titre était plus élevé dans CelCradle™ - 500A par rapport au CF de 4,78 × 10^6 unités infectieuse.

Nous avons également pu observer que l'inoculation de PPR et de RVF bloque la croissance cellulaire immédiatement après l'infection alors qu'après l'infection par le virus LSD, les cellules continuent leur croissance pendant 2 jours avant une baisse de viabilité. Pour les 3 virus, nous avons observé que le titre intracellulaire est supérieur au titre extracellulaire.

En conclusion, au terme de ce travail on peut dire que le système CelCradle offre de nombreux avantages à différents niveaux. La dimension 3D augmente la surface de culture, donne plus de flexibilité et une distribution confortable des cellules. De plus, la conception du système offre des conditions optimales de croissance cellulaire, d'oxygénation maximale et de transfert de nutriments. De plus, sa texture permet l'adhésion des cellules dans un milieu avec un niveau bas de sérum, ce qui réduit le coût de production. Ces avantages permettent à ce système de devenir un système simple et économique pour la culture cellulaire à haute densité et pour la production de virus.

BMC Veterinary Research

RESEARCH ARTICLE Open Access

Production of small ruminant morbillivirus, rift valley fever virus and lumpy skin disease virus in CelCradle™ -500A bioreactors

Halima Rhazi[1,2*], Najete Safini[2], Karima Mikou[1], Meryeme Alhyane[2], Khalid Omari Tadlaoui[2], Xiangliang Lin[3], Nandini P. Venkatesan[3] and Mehdi Elharrak[2]

Abstract

Background: Animal vaccination is an important way to stop the spread of diseases causing immense damage to livestock and economic losses and the potential transmission to humans. Therefore effective method for vaccine production using simple and inexpensive bioprocessing solutions is very essential. Conventional culture systems currently in use, tend to be uneconomic in terms of labor and time involved. Besides, they offer a limited surface area for growth of cells. In this study, the CelCradle™-500A was evaluated as an alternative to replace conventional culture systems in use such as Cell factories for the production of viral vaccines against small ruminant morbillivirus (PPR), rift valley fever virus (RVF) and lumpy skin disease virus (LSD).

Results: Two types of cells Vero and primary Lamb Testis cells were used to produce these viruses. The study was done in 2 phases as a) optimization of cell growth and b) virus cultivation. Vero cells could be grown to significantly higher cell densities of 3.04×10^9 using the CelCradle™-500A with a shorter doubling time as compared to 9.45×10^8 cells in Cell factories. This represents a 19 fold increase in cell numbers as compared to seeding vs only 3.7 fold in Cell factories. LT cells achieved modestly higher cell densities of 6.7×10^8 as compared to 6.3×10^8 in Cell factories. The fold change in densities for these cells was 3 fold in the CelCradle™-500A vs 2.5 fold in Cell factories. The titers in the conventional system and the bioreactor were not significantly different. However, the Cell-specific virus yield for rift valley fever virus and lumpy skin disease virus are higher (25 virions/cell for rift valley fever virus, and 21.9 virions/cell for lumpy skin disease virus versus 19.9 virions/cell for rift valley fever virus and 10 virions/cell for lumpy skin disease virus).

(Continued on next page)

* Correspondence: h.rhazi@mci-santeanimale.com
[1]Laboratory of functional and environmental ecology, Faculty of Sciences and Technology Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Imouzzer Road, BP 2202 Fez, Morocco
[2]Laboratory of Research and Development virology, MCI Animal Health, Lot. 157, Zone Industrielle Sud-Ouest (ERAC) B.P: 278, 28810 Mohammedia, Morocco
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(Continued from previous page)
Conclusions: This work represents a novel study for primary lamb testis cell culture in CellCradle™-500A bioreactors. In addition, on account of the high cell densities obtained and the linear scalability the titers could be further optimized using other culture process such us perfusion.

Keywords: CelCradle™ -500A, PPR virus, RVF virus, LSD virus, Vero cells, LT cells

Background

Animal vaccination is an important way to minimize the spread of diseases that cause enormous damage to livestock, leading to a substantial economical impact. Viruses can be successfully contained by a well-organized vaccination, using sufficient coverage and effective vaccines, which prompted pharmaceutical industries to seek for flexible, cost efficient and operative production technology.

Animal vaccine strains are commonly cultured on adherent cells and less frequently on suspension cells for commercial purposes. Adherent cells such as Vero cells are frequently cultured on 2-D systems such as roller bottles and Cell Factories. but all of them include complicated operation and provide low population densities of cells. Furthermore, they are time consuming and involve heavy operations .

Microcarriers such as Cytodex have also been largely used for adherent cells, offering good mixing and oxygen transfer but often resulting in low cell densities due to accumulation of toxic metabolites and a high shear stress. To alleviate the shear stress problem, other reactors have been developed such as hollow fiber [1], packed-bed bioreactors [2] and Wave bioreactors [3]. In general, they have the advantages of good mixing, aeration and nutrient supply, but require an exterior oxygenation system and sophisticated operation skills .

A novel, single-use bioreactor -the CelCradle™ -500A was evaluated in the current study for culture of adherent cells with the aim of cultivating viruses used in vaccine production for a number of veterinary diseases. This bioreactor for adherent cell culture has been reported to be used successfully for the production of Adeno-Associated Virus [4], Japanese encephalitis virus [5], insect cells for baculovirus production [6], bovine Herpesvirus-1 vaccine [7] and influenza virus [8]. It has also been used for culture of mammalian cells such as HEK 293 for production of G-protein [9], rat pancreatic duct-derived stem cells for insulin production [10] and CHO cells [11]. Previous studies have reported satisfactory results in terms of large surface area, low shear stress and good aeration thus enabling a high cell density and consequently high virus titers. The unique 3D environment provided by the matrices on which cells grow mimics a physiological environment for cell growth.

In this study, we evaluated the use of the CelCradle™ -500A bioreactor for the cultivation of Small ruminant morbillivirus or peste des petits ruminants (PPR), Rift valley fever (RVF) and Lumpy skin disease of cattle (LSD) viruses using two types of cells; Vero cells for PPR cultivation and RVF viruses and primary lamb testis cells (LT) for LSD virus.

PPR is a contagious viral disease of goats and sheep often associated with high morbidity and mortality [12]. Prophylactic administration of a live attenuated vaccine provides strong immunity and is the best method of disease prevention. The RVF virus (family of *Phenuiviridae*) causes a disease transmitted mainly by mosquitoes with potentially severe symptoms among both humans and animals. RVFV is an enveloped RNA virus characterized by a genome composed of three segments designated L, M and S of negative or ambisense polarity [13]. An effective way to establish solid herd immunity is through regular vaccination. Lumpy skin disease of cattle is caused by a DNA virus belonging to the *Poxviridae* family, *Capripoxvirus* genus. LSD is an acute contagious disease causing great economic losses due to skin damage, reduced milk production, mastitis, lowered fertility, and sometimes death due to secondary bacterial infections. Vaccination confers animals with a long-lasting immunity [14, 15].

Results

Cells growth kinetics

To minimize FBS percentage in growth medium for the culture of Vero cells, cells wer cultured in DMEM with different percentages of FBS, (1,3 and 5%) for a total of 168 h. The seed obtained from T-flasks (525 cm^2) was used to inoculate a CelCradle bottle at a cell density of 1.5×10^8 cells/bottle in each of these culture medium. After 24 h of incubation, the highest cell attachment was achieved in 1% FBS medium with a total of 2.3×10^8 cells/bottle, followed by 2.1×10^8 cell/bottle in 5% FBS, and 1.7×10^8 cell/bottle in 3% FBS (Fig. 1) at 3 h post-seeding. The optimal cell density was achieved at different time points of the culture as shown in Fig. 1.

The kinetics of LT cell growth in the CelCradle™ -500A system over a period of 10 days is represented in Fig. 2. 2.0×10^8 cells/bottle was seeded at day 1 (D1), Peak cell densities were observed at Day 7 of culture with a total nmber of 6.7×10^8 cells/ bottle and a drastic drop in cell numbers there after.

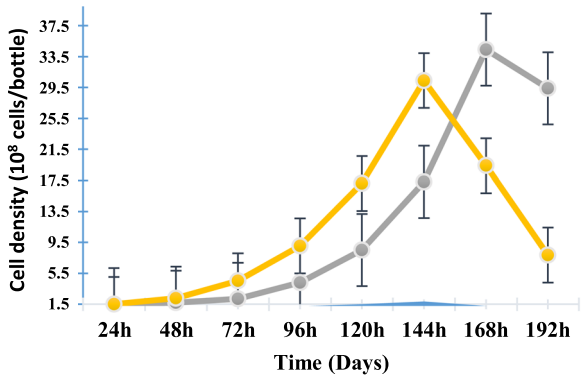


Fig. 1 Kinetics of Vero cell growth in medium supplemented by 5% (5F, blue), 3% (3F, grey), and 1% (1F, yellow) FBS in the CelCradle™ - 500A

A comparison is made between cell growth from cultures in conventional CF s and the CelCradle™ -500A system (Table 1). In cell factories, the seeding density was 40,000 cells/cm^2 for both cell types. The cell density at harvest after 4 days/6 days post-seeding was 150,000 cells/cm^2 and 98,000 cells/cm^2 for Vero and LT cells respectively. This represents a 3.7-fold and 2.5-fold increase in cell numbers as compared to seeding. Vero cell growth increased by 19-fold in the CelCradle™ -500A as compared to the seeding density whereas LT cells showed a modest increase of only 3 –fold.

Vero cells had a doubling time (DT) of 24 h in Cell Factories versus 28 h in Celcradle system. For LT cells the DT was 76 h in Cell Factories and 86 h in Celcradle system.

Virus growth kinetics

PPR virus

As described previously, Vero cells grew optimally in medium containing 1%FBS. This condition was used for all subsequent experiments. Vero cells were inoculated when total cell numbers were 22 × 10^8 cells/bottle at D4 with PPR virus as described previously (Fig. 3a).

For the next 3 days, cell numbers did not increase (21.99, 22.01, and 22.03 cells/bottle). PPR virus titers however started to increase (from 4.4 to 5 $\log_{10}$TCID50/ml) as represented in Fig. 3a below. At the time when cells start excreting virions, there was a drastic drop in cell numbers decreases 8 × 10^8 cells/bottle. In Fig. 3b we compared titers of the total extracellular and intracellular virus. There is a small difference between the two titers, 4 to 5 days post infection.

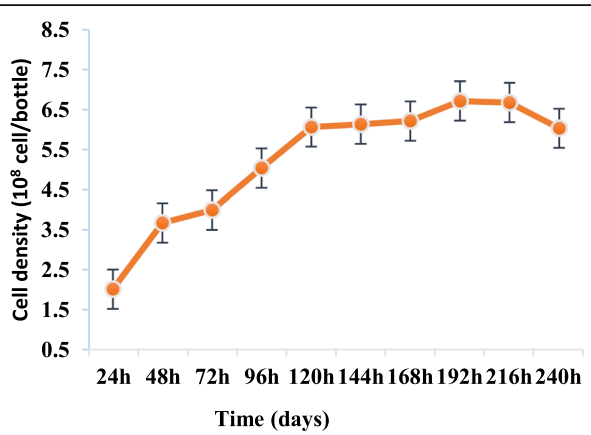


Fig. 2 Kinetics of LT cell growth in medium supplemented with 10% FBS in the CelCradle™ - 500A

RVF virus

Figure 4a represents kinetics of RVF virus growth on Vero cells during 11 days of cultivation. Cells were inoculated with the virus when total cell numbers were 24 × 10^8 cells per bottle. As expected, cell numbers drop after inoculation with the virus as soon as 24 h post-innocultion and at day 5 show a drastic drop in cell numbers with a corresponding increase in viral titer. Figure 4b represents the titers of the total extracellular and intracellular virus. After 4 days, the extracellular virus had a titer of 7.6 $\log_{10}$TCID50/ml and intracellular virus of 7.8 $\log_{10}$TCID50/ml after 5 days of inoculation.

LSD virus

Cells were inoculated at day 5 with the LSD virus at an MOI of 0.01 and when total cell numbers were 2.2 × 10^8 cells/bottle. At 4 dpi, LT cells reached their maximum cell concentration of 3.6 × 10^8 cells/bottle (Fig. 5a). The cells started to secrete LSD virions into the extracellular environment at this point. At D8 post infection, cells secrete the most number of virions as reflected by viral titers (6.9 $\log_{10}$TCID50/ml) while cell densities dropped to 1.8 x10^{8}cells/bottle.

At day 8, extracellular virus titer was 6.4 $\log_{10}$TCID50/ml whereas intracellular virus is 6.9 (6.6 $\log_{10}$TCID50/ml) (Fig. 5b).

Table 2 is a comparison of the titers of PPR, RVF and LSD viruses obtained by cultivation in 2 culture systems. In Cell Factories, the PPR titer was 6.3 $\log_{10}$TCID50/ml after 5 days of incubation, LSD was 6.5 $\log_{10}$TCID50/ml after 5 days of incubation and RVF was 7.8 $\log_{10}$TCID50/ml after 4 days of incubation. In CelCradle™ - 500A bioreactor,the PPR titer obtained was 6.4 $\log_{10}$TCID50/ml after 7 days of incubation, and LSD virus titers were 6.9 $\log_{10}$TCID50/ml after 8 days and 7.8 $\log_{10}$TCID50/ml for RVF after 5 days of incubation.

Discussion

Peste des Petits Ruminants, Rift Valley fever and Lumpy skin disease are among the most frequent and devastating diseases of livestock in Africa and Asia [12, 13, 15].

Table 1 Comparison of cell densities between Cell Factory and CelCradle™ -500A culture systems

	Vero cells		LT cells	
	CelCradle™-500A	Cell Factory	CelCradle™-500A	Cell Factory
Inoculum (cell/ cm^2)	10,000	40,000	15,000	40,000
Harvest (cell/ cm^2)	192,000	150,000	43,000	98,000
Incubation time (days)	5	4	8	6
Fold-increase in cell numbers	× 19	× 3.7	× 3	× 2.5
Cell doubling time (h)	28 h	24 h	86 h	76 h
Medium volume (ml/cm^2)	32 ml	237 ml	32 ml	237 ml

Those diseases can only be controlled by preventive measures through vaccination. As for RVF, vaccination is necessary not only to immunize animals but also to prevent animal to human transmission.

Most of the veterinary vaccines are produced in adherent cells; Vero cells are the preferred substrate for PPR and RVF viruses, and LT primary cells are the preferred substrate for LSD viruses [16–18]. Currently, these cells are cultured in open systems using Cell factories or roller bottles, which lead to a high risk of contamination. These systems have the added disadvantage of a large footprint and are labour -intensive as well. The conventional CF and roller bottles also involve lengthy handling operations, in addition CF provide poor oxygen transfer and present surface area limitations leading to low cells densities [9, 19]. Therefore, the development of an efficient adherent cell culture process is desirable.

Various types of bioreactors have been used for adherent cells like hollow fiber, packed-bed and disposable Wave bioreactors. They offer good oxygenation but they necessitate sophisticated skills to operate. In this study we evaluated the CelCradle™ -500A system, for the production of LSD vaccine on LT primary cells and RVF and PPR vaccines on Vero cells. Our evaluation was based on (i) the comparison of the cell growth of the two type of cells in the CelCradle™ -500A and Multitrays (ii) comparison of viral titers of the 3 respective viruses obtained in both systems.

To reduce serum percentage in growth medium for the culture of Vero cells, cells were cultured in DMEM with different percentages of FBS, (1,3 and 5%). the most important cell attachment was achieved in 1% FBS medium with a total of 2.3×10^8 cells/bottle after 3 h of incubation.

Cell gowth kinetics were evaluated for the 2 different cell types using conventional Cell Factories and the CelCradle™-500A. For Vero cells, a 19-fold increase in cell growth as compared to seeding density with a corresponding decrease in doubling time was observed. This is advantageous from the point of scale-up strategies and

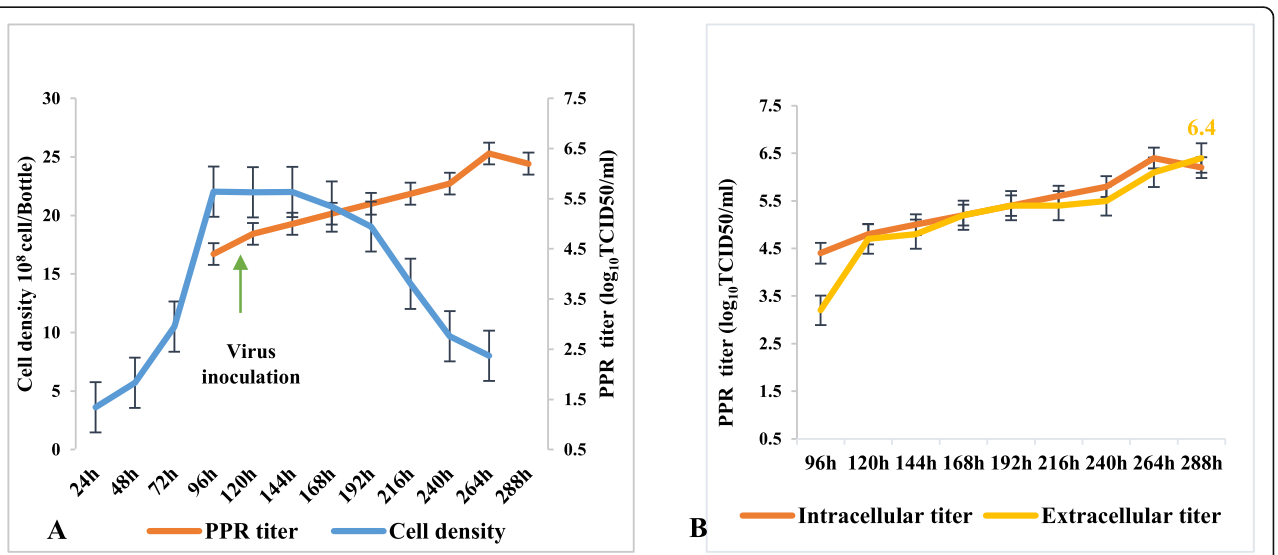


Fig. 3 a Kinetics of Vero cell growth in 1% FBS-containing media and PPR virus titer. **b** Comparison of titers between extracellular and intracellular virus

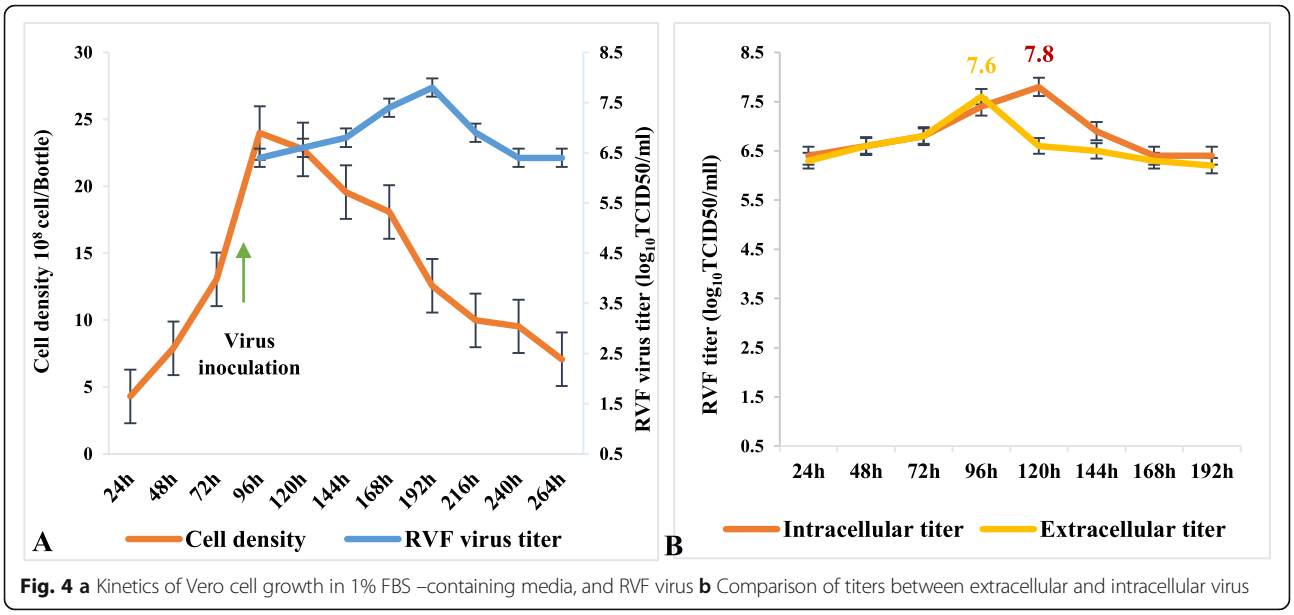


Fig. 4 a Kinetics of Vero cell growth in 1% FBS –containing media, and RVF virus **b** Comparison of titers between extracellular and intracellular virus

to obtain higher virus titers as a results of high cell densities.

The CelCradle thus facilitates an enhancement in cell proliferation as compared to conventional culture system such as the CF. In a similar study carried out in Japan with Vero cells by Hiroko et al. (2007), the author reported a total cell number of 28×10^8 cells/bottle of 7 days of incubation as compared to 30×10^8 cells/bottle in 5 days in our study [5]. Different types of microcarriers were used for Vero cells cultivation achieving a lower cell concentration; 1.35×10^5 cells/ml, 1.55×10^5 cells/ml, 2×10^5 cells/ml, 2.40×10^5 cells/ml, 4.7×10^5 cells / ml, 5×10^5 cells/ml, 1×10^6 cells/ml, 1.85×10^6 cells/ml, and 2.6×10^6 cells/ml [20–23].

Typical cell doubling time of Vero cells is 24 h [24], which given by CF in our study. On CelCradle™ -500A system we obtained a DT of 28 h. which is consistent with a relatively longer cell doubling time of 28–38 h in a study carried out by Yang et al. to examine Vero cells bead to bead transfer in spinner flasks with microcarriers. Therefore, it appears that, when the Vero cells were cultured on Cytodex, the doubling time of Vero cells was usually longer than 24 h [25]. In addition, Lai et al. (2019) reported a doubling time for Vero cells of

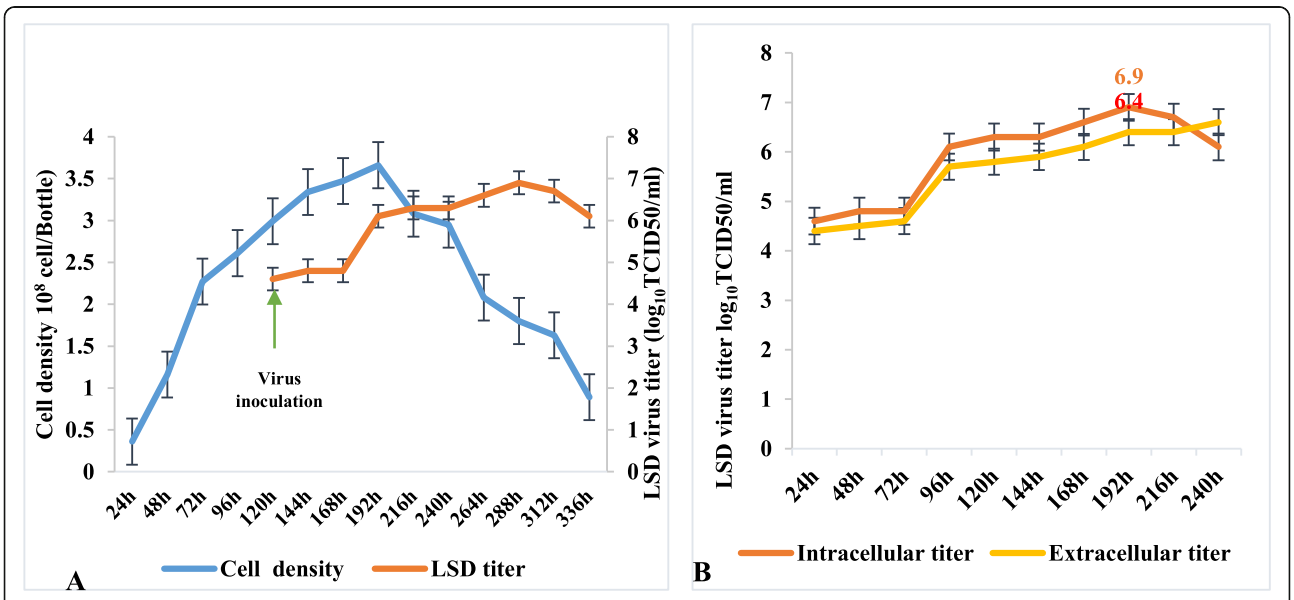


Fig. 5 Kinetics of LT cell growth in 10% FBS containing media and LSD virus titers B. Comparison of titers between extracellular and intracellular virus

Table 2 Comparison of viruses titers and incubation time using Cell Factories and Celcradle systems

Viruses	Incubation period (Days)		Virus titer (log_{10}TCID50/ml)		Cell-specific virus yield (virions/cell)	
	CelCradle™-500A	Cell Factory	CelCradle™-500A	Cell Factory	CelCradle™-500A	Cell Factory
PPR	7	5	6.4	6.3	1.29	6.33
RVF	5	4	7.8	7.8	25	19.9
LSD	8	5	6.9	6.5	21.9	10

44.4 h using the Celcradle system which proves the efficiency of our cell growth conditions [8].

LT cells were grown in the CelCradle™-500A to a total number of 6.7×10^8 cells/bottle after 8 days of culture; with CF's, we obtained 6.23×10^8 cells/bottle after 6 days of culture. The CelCradle therefore yields a few higher cell numbers than the CF's. To date, very few studies have reported efficient cultivation of primary cells using the CelCradle™ -500A system. Chen et al. in (2016) differentiate rat pancreatic duct- derived stem cells (PDSCs) and successfully obtained after 10 -fold increase in cell density at the end of the culture period of 7 days [10]. In 2007 S. Frauenschuh et al. cultivated primary mesenchymal stem cells on Cytodex microcarriers given a cell concentration of 10,000/14 ml [26].

The CF has an added disadvantage in that after 6 days of culture, cell numbers dropped drastically and showed a steep decrease in viability. This is due to pH regulation difficulty, low aeration and metabolites limitation. Such problems were not encountered in CelCradle™-500A cultures.

In this work, we studied kinetics of three viruses on two different production systems. The obtained viral titers were similar in both systems for PPR and RVF viruses. As for LSD virus, the titer was higher in CelCradle™ - 500A as compared to CF by 4.78×10^6 infectious units of virus/ml. The run time was one to 3 days longer in CelCradle™ -500A than in CF, it was also reported to be 6 days longer by Lewis Ho et al. in 2004, where it was shown that the cultivation of HEK 293 cell line using Celcradle system took 12 days using Celcradle system versus 6.5 days using Cell Factories system [9].

The virus characteristics and impact on the cell substrate was variable in the 3 viruses cultivated in the CelCradle. PPR and RVF inoculation block cell growth immediately after infection whereas after LSD virus infection, cells continue their growth for 2 days before a drop in viability. This can be explained by the fact that LSDV is an intracellular virus with slow replication as compared with PPR and RVF. For the 3 viruses, we observed that intracellular titer is higher than the extracellular one. This could be explained by the fact that the virus in the supernatant is diluted in the medium.

Conventional culture systems for adherent cells tend to reduce cell growth because of their space limitation and design. The CelCradle™-500A system offers many advantages at different levels. The 3D environment increases surface area for culture, a uniform distribution of cells and maximum aeration and nutrition by virtue of the "Tide motion" principle. This provides low shear stress, high aeration with no O_2 limitation, and a foam-free culture environment. Thus, optimum cell density and consequently, high viral titers are possible. Moreover, macrocarriers –the matrices for cell growth allows the adherence of Vero cells in low serum medium, which reduces the cost of the production.

Owing to the simple design, this system is extremely easy to handle and operate and can be used for small-scale vaccine production and for preparation of seed trains. These benefits enable it to become a simple and economical system for high-density cell culture and virus production. It has been successfully utilized to grow primary cells, and to produce PPR, RVF and LSD vaccines.

Viral titers were comparable in both systems. Since all our trials were done without medium replenishment, these titers could be optimized by the usage of a perfusion system, and this being a continuous system could enhance volume of virus harvested and possibly the titer as well.

Conclusion

Taking into consideration that the CelCradle™ -500A is a laboratory scale bioreactor which yields titers equivalent to Cell factories that are conventional industrial scale systems, this represents a promising preliminary study for potential use of a novel bioreactor. It important to mentionne that cultures in the the Tide motion bioreactors are linearly scaeable and production of the 3 viruses reported here can be readily scaled up in TideXcell 2-5000 L bioreactors.

Methods

Cells and viruses

Vero cells were purchased from ATCC (no. CCL-81) and initially cultivated in 1, 3 or 5% of foetal bovine serum (FBS)-containing DMEM medium for the purpose of selecting the optimal conditions for further cell cultivation and virus production experiments. Primary lamb testis cells LT, were obtained by castration of a healthy 3 month old male and obtaining cells from the testis. Cells were prepared and propagated in Dulbecco's modified

Eagle's medium supplemented with 10% FBS. Three attenuated vaccine strains were used in this study: PPRV Nigeria 75 strain [27], RVF Clone 13 T virus [28] and LSD virus Neethling strain [29].

Bioreactor system

The CelCradle™ - 500A is a single-use bioreactor capable of yielding high-density cell cultures for production of vaccines, recombinant proteins and monoclonal antibodies. The bioreactor used in this study consists of two compartments; an upper chamber made of polyethylene terephthalate containing 5.5 g of macrocarriers which provide the matrices for cell adherence and growth and a lower compressible chamber (LCC) of low-density polyethylene containing the medium. The cap is equipped with a 0.22 μm PTFE filter.

The CelCradle was mounted on a stage and the parameters for cultivation were set using a control unit. The upward and downward movement of the media provides a "Tide motion". Cells on the macrocarriers thus receive an alternating cycle of aeration and nutrition.

Cell culture

Macrocarriers were equilibrated in 400 ml of media. Following this, 100 ml of the respective cells was added in to individual CelCradle™-500A bioreactors.

Cell seeding and attachment period was for 3 h. After this period of incubation, 2 macrocarriers were sampled using sterile forceps, fixed with 2 ml of 95% ethanol, stained with 2 ml of Trypan blue, and were observed microscopically to visualise cell attachment. After determining that the cell attachment was more than 90%, the Tide motion parametres were changed to cell cultuvation. The Tide motion parametres of cell seeding and cell cultivation were as follows:

Tide motion	Rising rate	Top holding time	Down rate	Bottom holding time
Cell attachment	2 mm/sec	20 s	2 mm/sec	0 s
Cell cultivation	1.5 mm/sec	20 s	1.5 mm/sec	0 s

Cell density on carriers was also evaluated by a crystal violet dye (CVD) nucleus staining method with 2 macrocarriers taken from the bottle. The carriers were incubated at 37 °C with 1 ml of CVD and vortexed every 15 min. A hemocytometer was then used to count the nuclei as a readout for the number of cells.

The cell doubling time was calculated with the following formula:

Cell doubling time (DT) = ln2/μ, Where $\mu = \ln X_n - \ln X_{n-1} / t_n - t_{n-1}$.

t: time of sampling (hours), X: cell number at t (cells/bottle).

Experiments were executed in 2 phases: Phase 1 and Phase 2 for optimizing cell-growth and virus culture respectively. Initially, the cell growth kinetics was investigated for Vero cells. Optimum FBS concentrations for Vero cell culture was determined using 1, 3 and 5% serum in the medium. The optimal medium was then used for subsequent virus propagation experiments. For phase 1, seeding cell concentration for Vero cells was 11.36×10^3 cells/cm^2 for each of the 3 types of medium. In the phase 2 of virus production, cell seeding was 22.72×10^3 cells/cm^2 .

For LT cells, the feasibility of growing them on the carriers was determined before subsequent experiments. Cell concentration used was 1.7×10^3 cells/cm$^{2.}$ This was essential to determine if indeed primary cells could be cultivated on the carriers. For the virus production experiments, cell seeding of LT cells was 2.77×10^3 cm$^{2.}$

Cell seeding for cell growth experiments (cells/bottle)		Cell seeding for virus production experiments (cells/bottle)	
LT cells	*Vero cells*	*LT cells*	*Vero cells*
2.25. 10^7	15×10^7	3.66×10^7	30×10^7

In parallel as a head-to-head comparison, Cell Factories (CF, Nunc 10 chamber) with a total surface area of 6320 cm^2, were seeded with 3.99×10^4 cells/cm^2 LT cells or Vero cells (with 1500 ml of DMEM supplemented with 5% FBS) and incubated at 37 °C with 5% CO_2.

Virus production

Culture medium in each of the 3 bottles CelCradles was replaced by 300 ml of DMEM containing 1%FBS. Cells were inoculated with viruses at an MOI of 0.01 on day 4 for PPR and RVF and on day 5 for LSD virus, already adapted to the respective cells. The titers of the seeded viruses were 6,2 (log_{10}TCID50/ml) for PPR, 7,5 (log_{10}TCID50/ml) for RVF and 6,3 (log_{10}TCID50/ml) for LSD.

After a virus adsorption period of 3 h, 200 ml more of medium was added to each of the CelCradles.

The Tide motion parameters were changed to the following:

Rising rate	Top holding time	Down rate	Bottom holding time
1.0 mm/sec	20 min	1.0 mm/sec	0 s

Virus titration

Two samplings of the macrocarriers were carried out daily until D10 post infection in order to determinate the virus growth kinetics. Two milliliter of the supernatant culture medium containing secreted virus, extracellular virus, was obtained at each sampling and stored at 4 °C. Two

macrocarriers were also sampled for intracellular virus and stored at – 20 °C until titration. The intracellular virus was obtained by lysing the cells by a freeze/thaw cycle.

For virus titration assays, Vero/LT cells were seeded at a density of 110, 000 cells/well and (100 µl) of serially diluted virus was added to each well. After an incubation period of 96 h at 37 °C, the virus titer was determined by IPMA assay as described by Andy et al, 2020 [30].

Abbreviations

PPR: Small ruminant morbillivirus; RVF: Rift valley fever virus; LSD: Lumpy skin disease; LT: Lamb testis; DT: Doubling time; LCC: Lower compressible chamber; CVD: Crystal violet dye; CF: Cell Factory

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

H.R, N. S and M.E: Writing the original draft preparation, H. R, N. S, and M.A: Lab work, K. M, N.P.V, X. L, and K.O.T: Edditing the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

This research didn't involve animal trials.

Consent for publication

this manuscript didn't include details, images, or videos relating to an individual person.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

[1]Laboratory of functional and environmental ecology, Faculty of Sciences and Technology Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Imouzzer Road, BP 2202 Fez, Morocco. [2]Laboratory of Research and Development virology, MCI Animal Health, Lot. 157, Zone Industrielle Sud-Ouest (ERAC) B.P: 278, 28810 Mohammedia, Morocco. [3]Esco Aster, 21 Changi South Street 1, Singapore 48677, Singapore.

Received: 11 September 2020 Accepted: 16 February 2021
Published online: 27 February 2021

References

1. Ala-Uotila S, Marjamäki A, Matikainen MT, Jalkanen M. Use of a hollow fiber bioreactor for large-scale production of α2-adrenoceptors in mammalian cells. J Biotechnol. 1994;37(2):179–84.
2. Hu YC, Kaufman J, Cho MW, Golding H, Shiloach J. Production of HIV-1 gp120 in packed-bed bioreactor using the vaccinia virus/T7 expression system. Biotechnol Prog. 2000;16(5):744–50.
3. Singh V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. Cytotechnology. 1999;30(1–3):149–58.
4. Huang KS, Lo WH, Chung YC, Lai YK, Chen CY, Chou ST, et al. Combination of baculovirus-mediated gene delivery and packed-bed reactor for scalable production of adeno-associated virus. Hum Gene Ther. 2007;18(11):1161–70.
5. Toriniwa H, Komiya T. Japanese encephalitis virus production in Vero cells with serum-free medium using a novel oscillating bioreactor. Biologicals. 2007;35(4):221–6.
6. Hu YC, Te Lu J, Chung YC. High-density cultivation of insect cells and production of recombinant baculovirus using a novel oscillating bioreactor. Cytotechnology. 2003;42(3):145–53.
7. (PDF) Production of Bovine Herpesvirus-1 Vaccine Strains in MDBK Cells Using BelloCell Bioreactor [Internet]. [cited 2020 Jun 1]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/291689324_Production_of_Bovine_Herpesvirus-1_Vaccine_Strains_in_MDBK_Cells_Using_BelloCell_Bioreactor
8. Lai C-C, Weng TC, Tseng YF, Chiang JR, Lee MS, Hu AYC. Evaluation of novel disposable bioreactors on pandemic influenza virus production. PLoS One. 2019;14(8):e0220803.
9. Ho L, Greene CL, Schmidt AW, Huang LH. Cultivation of HEK 293 cell line and production of a member of the superfamily of G-protein coupled receptors for drug discovery applications using a highly efficient novel bioreactor. Cytotechnology. 2004;45(3):117–23.
10. Chen XC, Liu H, Li H, Cheng Y, Yang L, Liu YF. In vitro expansion and differentiation of rat pancreatic duct-derived stem cells into insulin secreting cells using a dynamic three-dimensional cell culture system. Genet Mol Res. 2016;15(2).
11. Wang IK, Hsieh SY, Chang KM, Wang YC, Chu A, Shaw SY, et al. A novel control scheme for inducing angiostatin-human IgG fusion protein production using recombinant CHO cells in a oscillating bioreactor. J Biotechnol. 2006;121(3):418–28.
12. Kabir A, Hussain Kalhoro D, Hussain Abro S, Saleem Kalhoro M, Ali Yousafzai H, Shams S, et al. Peste des petits ruminants: a review. Pure Appl Biol. 2019;8(2):1214–22[cited 2020 Jun 1]. Available from:. https://doi.org/10.19045/bspab.2019.80063.
13. Bunyaviruses - Medical Microbiology - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2020 Jun 1]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8004/
14. Abdulqa HY, Rahman HS, Dyary HO, Othman HH. Lumpy skin disease. Reprod Immunol Open Access. 2016;01(04).
15. Tuppurainen ESM, Venter EH, Shisler JL, Gari G, Mekonnen GA, Juleff N, et al. Review: Capripoxvirus diseases: current status and opportunities for control. Transbound Emerg DisBlackwell Publishing Ltd. 2017;64:729–45.
16. Sousa M, Fenge C, Rupprecht J, Tappe A, Greller G, Alves P, et al. Process intensification for Peste des petites ruminants virus vaccine production. Vaccine. 2019;37(47):7041–51.
17. Boumart Z, Daouam S, Bamouh Z, Jazouli M, Tadlaoui KO, Dungu B, et al. Safety and immunogenicity of a live attenuated Rift Valley fever recombinant arMP-12ΔNSm21/384 vaccine candidate for sheep, goats and calves. Vaccine. 2019;37(12):1642–50.
18. (PDF) Alternative cell lines for the propagation of lumpy skin disease virus [Internet]. [cited 2020 Jun 1]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/11764711_Alternative_cell_lines_for_the_propagation_of_lumpy_skin_disease_virus
19. Te Lu J, Chung YC, Chan ZR, Hu YC. A novel oscillating bioreactor BelloCell: implications for insect cell culture and recombinant protein production. Biotechnol Lett. 2005;27(15):1059–65.
20. Nor YA, Sulong NH, Mel M, Salleh HM, Sopyan I. The growth study of Vero cells in different type of microcarrier; 2010. May 2014
21. Profile SEE. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell culture using a microcarrier system; 1994. January 2015
22. Wu S, Liu C, Lian W. Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development. Vaccine. 2004;22:3858–64.
23. Mohan M, Koteeswaran A, Chandran NDJ. High titre peste des petits ruminants (ppr) vaccine virus production on cytodex 1 microcarrier culture. Microcarriers Stock Cultures. 2009;5(August):149–54.
24. Tsui TY. Limitation in controlling the morphology of mammalian Vero cells induced by cell division on asymmetric tungsten-silicon oxide Nanocomposite; 2020.
25. Yang J, Guertin P, Jia G, Lv Z, Yang H, Ju D. Large - scale microcarrier culture of HEK293T cells and Vero cells in single - use bioreactors. AMB Express. 2019. https://doi.org/10.1186/s13568-019-0794-5.
26. Frauenschuh S, Reichmann E, Ibold Y, Goetz PM, Sittinger M, Ringe J. A microcarrier-based cultivation system for expansion of primary Mesenchymal stem cells; 2007.
27. Diallo A, Taylor WP, Lefèvre PC. Provost A. Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants: candidat pour un vaccin homologue vivant. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux. 1989;42(3):311-9. https://doi.org/10.19182/remvt.8771.
28. Daouam S, Ghzal F, Naouli Y, Tadlaoui KO, Ennaji MM, Oura C, et al. Safety and immunogenecity of a live attenuated Rift Valley fever vaccine (CL13T) in camels; 2016.

29. Capstick PB, Coackley W. Protection of cattle against lumpy skin disease. Res Vet Sci. 1961;2(4):362–8.
30. Haegeman A, De Leeuw I, Mostin L, Van Campe W, Aerts L, Vastag M, et al. An Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) for the detection of lumpy skin disease antibodies. J Virol Methods. 2020;277:113800.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

BMC

2. Effet des phytohormones sur la qualité du milieu de culture cellulaire

Les phytohormones ou hormones végétales sont de petites molécules ou substances organiques naturelles qui influencent les processus physiologiques des plantes à de très faibles concentrations. Les phytohormones sont des messagers chimiques qui coordonnent les activités cellulaires des plantes. Les phytohormones régulent la division et la différenciation cellulaire.

Certaines hormones végétales sont similaires aux hormones animales ou peuvent être produites par des cellules animales. Les effets des hormones végétales sur les cellules animales ont récemment retenu beaucoup d'attention ; cependant, l'impact des phytohormones sur la division cellulaire des mammifères est mal compris. Aucune étude n'a examiné l'utilisation et les effets de ces phytohormones sur Vero ou les cellules primaires. L'objectif de cette partie d'illustrer les effets de trois phytohormones (auxine, kinétine et acide gibbérellique) sur la croissance et la cinétique des cellules cardiaques Vero et embryonnaires, la viabilité, la morphologie cellulaire et de déterminer les concentrations optimales de chaque phytohormone qui pourraient être utilisées dans les deux types de cultures cellulaires. Nous avons également présenté l'impact de ces hormones sur le pH et le glucose dans les milieux de culture cellulaire des deux cellules.

Dans cette partie, en vue d'améliorer la qualité du milieu de culture cellulaire, des phytohormones sont intégrées à ce milieu et l'effet de cet ajout sur le rendement cellulaire, la cinétique de la croissance cellulaire et la morphologie des cellules a été examiné et comparé aux témoins mis en culture sur milieu sans adjonction de phytohormones.

Les phytohormones testées sont l'auxine, la kinétine et l'acide gibbérellique. Des solutions éthanoliques de 1g/ml de chaque phytohormone ont été préparées puis ajoutées au milieu DMEM et conservés à +4 °C jusqu'à utilisation.

Le test MTT a été utilisé pour déterminer les concentrations optimales pour les paramètres recherchés. Ce test renseigne sur la viabilité cellulaire. Dans cet essai, le MTT soluble est métabolisé par l'activité enzymatique mitochondriale des cellules viables en un produit formazan coloré insoluble qui présente une absorbance à 540 nm.

La réalisation de ce test est faite en ensemençant 14,4 ml de suspension cellulaire dans des microplaques de 96 puits. Des dilutions décroissantes de phytohormones (pour donner une dilution finale de 1/1024) ont été ajoutées et les microplaques ont été incubées pendant 72 h à 37°C et 5 % de CO_2. Le contrôle cellulaire est préparé de la même façon dans des puits sans phytohormones. Après

incubation des microplaques, 10 ml de solution de MTT ont été ajoutés à chaque puits et incubés pendant 3 h. Ensuite, le milieu contenant du MTT a été remplacé par du DMSO et pipeté pour dissoudre tous les cristaux de formazan formés. Enfin, l'absorbance est lue à 540 nm par un lecteur de plaque ELISA. L'effet de chaque concentration de phytohormone utilisée est évalué dans trois puits et l'expérience est répétée trois fois.

Les résultats obtenus par le test MTT ont été utilisés pour calculer le pourcentage de viabilité à l'aide de la formule suivante : % viabilité : 100 x (Ac – At)/Ac ; avec at : Absorbance du test et Ac : Absorbance du contrôle.

Afin d'évaluer l'effet des phytohormones sur le rendement cellulaire et de choisir la concentration optimale pour la croissance cellulaire nous avons ensemencé des cellules Vero et des cellules embryonnaires du cœur d'agneau (40 000 cellules/cm^2) dans des F25 cm^2 et les trois phytohormones ont été ajoutées séparément. Pour le contrôle, le flacon a été ensemencé sans phytohormones. Ensuite les flacons ont été incubés pendant 72 h à 37 °C et 5 % de CO_2. La trypsination a été effectuée pour les cellules pour déterminer le rendement cellulaire. Le rendement cellulaire a été calculé comme suit : nombre total des cellules/surface du flacon utilisé.

Les effets des phytohormones sur la cinétique de la croissance cellulaire ont été évalués pendant une période de 6 jours. La densité cellulaire quotidienne a été évaluée par la méthode trypan bleu. Dix-huit F25 cm^2 ont été ensemencés avec 40 000 cellules/cm^2 pour les cellules Vero et les cellules cardiaques. Chaque phytohormone a été ajoutée à 6 F25 cm^2 avec les concentrations optimales préalablement définies (1/128 pour la kinétine, 1/32 pour l'acide gibbérellique, et 1/4 pour l'auxine). Les témoins sont ensemencés avec la même concentration cellulaire et sans phytohormones. Les cellules sont chargées dans un hémocytomètre pour être examinées au microscope inverse à faible grossissement. Le nombre total de cellules non colorées est compté.

Pour l'étude de la morphologie cellulaire, la technique de coloration May Grünwald - Giemsa est appliquée sur des cellules traitées ou non par les phytohormones. Pour ceci, 150 000 cellules/ml ont été ensemencées dans des plaques à 6 puits (2 ml/puits), chaque puits a servi à un type de phytohormone. Après 24 heures d'incubation, les plaques sont colorées selon la technique de May Grünwald - Giemsa.

L'effet des phytohormones sur le pH du milieu et sur la consommation de glucose par les cellules est également recherché.

Les résultats du MTT ont montré qu'il existe une différence significative entre la viabilité des cellules traitées par les phytohormones et les cellules témoins non traitées. Les concentrations adéquates pour l'auxine est de 1/2 à 1/32 pour les deux types de cellules avec une amélioration moyenne de la viabilité cellulaire de 12,5 % pour les cellules cardiaques et de 16,2 % pour les cellules Vero traitées par l'auxine**.** Sous l'effet de la Kinétine, la viabilité augmente par les concentrations allant de 1/16 à 1/256, avec un taux d'induction moyen de 44,83% pour les cellules du cœur et 41,55% pour les cellules Vero. Quant à la Gibbérelline, les concentrations qui donnent une meilleure induction pour les cellules cardiaques sont de 1/32 à 1/512 avec une amélioration de la viabilité moyenne de 41,76% ; cette concentration optimale est de 1/16 à 1/256 pour les cellules Vero avec une amélioration de la viabilité moyenne de 5,6%.

Selon ces résultats, on voit que les phytohormones stimulent la viabilité des cellules embryonnaires du cœur plus que celle des cellules Vero et que la meilleure induction est obtenue avec de la kinétine.

La comparaison du rendement cellulaire a montré que les concentrations idéales pour les deux types de cellules sont de 1/4 pour l'auxine, 1/128 de gibbérelline et 1/32 de kinétine. Selon nos résultats, les phytohormones stimulent le rendement des cellules embryonnaire du cœur plus que celui des cellules Vero. La Gibbérelline est le stimulateur le plus puissant des cellules du cœur (200 000 cell/cm^2) et les cellules Vero sont les plus sensibles à la kinétine (180 000 cell/cm^2).

L'augmentation de la croissance cellulaire a été confirmée par la consommation de glucose et la réduction du pH du milieu de culture cellulaire. Les résultats des tests ont montré que le pH et la concentration du glucose les plus bas sont observés dans la culture des cellules du cœur supplémentés par la kinétine suivis par les cultures en présence de gibbérelline et puis celles supplémentées d'auxine ; ceci montre que c'est la kinétine qui est l'hormone la plus favorable pour induire la croissance des cellules du cœur. Néanmoins, pour les cellules Vero, les valeurs du pH et de la concentration du glucose ont chuté pour la culture additionnée de gibbérelline suivie de la kinétine et de l'auxine. Ces résultats montrent que l'effet des hormones dépend de la nature des cellules et du type d'hormone.

Notre travail a également montré que les phytohormones testées ont agi sur la morphologie cellulaire, en particulier, l'auxine qui a entrainé une dilatation cellulaire en plus de la modification de la forme des cellules. Les phytohormones ont également agi sur la qualité du tapis cellulaire qui,

après coloration, apparait clair sans aucune tache foncée comme c'est le cas du tapis cellulaire du témoin. Ceci pourrait être attribué à l'effet des phytohormones sur la réduction du stress cellulaire qui peut accompagner la culture des cellules et entrainer la mort cellulaire; ce qui justifie également l'effet positif des phytohormones sur le rendement cellulaire.

Growth kinetics and morphological characteristics of Vero and primary heart cells treated with the plant hormones Auxin, Kinetin, and Gibberellin

Halima Rhazi[1,2], Mehdi Elharrak[2], Hossam Hilal El Idrissi[2], Meryeme Alhyane[2], Khalid Omari Tadlaoui[2], Karima Mikou[1]

[1]Laboratory of functional and environmental ecology, Faculty of Sciences and Technology Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Imouzzer Road, BP 2202 Fez, Morocco

[2]Laboratory of Research and Development Virology, MCI Animal Health, Lot. 157, Zone Industrielle Sud-Ouest (ERAC) B.P: 278, 28810 Mohammedia, Morocco

Abstract

Plant phytohormones regulate plant growth and development. The plant produces a variety of hormones, including auxin, gibberellin, and kinetin. Over the past few years, there has been much attention focused on the effects of those hormones on animal cells.

In this study, we established the influence of three phytohormones on the most used cell line in vaccine production; Vero cells and primary Heart cells viability, growth and morphology. According to our results, Gibberellin stimulates the most growth and viability of Vero cells, while Kinetin enhances the growth of Heart cells. Auxin also enhances the proliferation of cells, as well as affects their morphology; cells with Auxin supplementation appear to be longer and well-expanded. We also revealed variations in pH and glucose consumption in cell cultures supplemented with the three phytohormones.

Keywords: Phytohormones, Auxin, Gibberellin, Kinetin, Vero cells, primary cells, cellular growth

Background

Phytohormones or plant hormones are naturally occurring small organic molecules or substances, which influence physiological processes in plants at very low concentrations [1]. Phytohormones are chemical messengers that coordinate the cellular activities of plants [2]. Phytohormones regulate cellular division and differentiation [3].

From the early discovery of auxin as the first phytohormone [4] to the most recent identification of strigolactones (SL) [5], nine categories of phytohormones, that is, auxins, cytokinins (CK), gibberellins (GA), abscisic acid (ABA), ethylene (ETH), brassinosteroids (BR), salicylates (SA), jasmonates (JA) and strigolactones (SL), have been identified so far. Phytohormones perform their biological functions via overlapping or specific signaling pathways [6].

Auxin produced by plants is indole-3-acetic acid which modulates cell division, extension and differentiation and is crucial in several processes including tropism, root initiation, apical dominance and senescence [7].

(CKs) are an adenine as well as non-adenine derived heterogeneous class of regulatory molecules that participate in almost every aspect of plant biology [8].

Gibberellic acid (GA), is a tetracyclic di-terpenoid compound that stimulates growth and development along with an interaction of different environmental conditions including light, temperature and water [9]. Certain plant hormones are similar to animal hormones or can be produced by animal cells [10]. The effects of plant hormones on animal cells have gained much attention recently; however, the impact of phytohormones on mammalian cell division is poorly understood. It was proved that auxin and kinetin have a positive effect on HEK293 and NIH3T3 mammalian cells [11]. For Gibberellic acid, there is a limited number of publications describing its effect on mammalian cells; in 2014 a study was conducted on the results of treatment of A431 (human epidermoid carcinoma) cells and HaCaT (human immortalized keratinocytes) with this phytohormone [12].

No study has examined the use and effects of these phytohormones on Vero or primary cells.

This study has the objective to illustrate the effects of three phytohormones (Auxin, Kinetin and Acid Gibberellic) on Vero and embryonic heart cells growth and kinetics, viability, cell morphology and to determine the optimal concentrations of each phytohormone that could be used in the two types of cell cultures. We also presented the impact of those hormones on pH and glucose in the cell culture media of both cells.

Material and methods

Cells

Vero cells (African green monkey kidney, Cat n◦: CCL-81) were provided by ATCC. Heart cells were prepared according to Rhazi et al. (2021). Briefly, cells were obtained from a three-month-

old fetus. The cardiac tissue was susceptible to enzymatic and mechanical dissociation into single cells. The two cell types were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Wisent Inc, cat n◦ 219− 015-XK), supplemented with 5% FBS for Vero cells and supplemented with 10 % FBS for Heart cells, and incubated at 37 ◦C with 5% CO_2.

Phytohormone preparation

Auxin (C8H5NHCH2COOH; M.M. 175, 18 g/mol) was purchased from LABO SI. Kinetin (6-Benzylaminopurine C12H11N5; M.M. 225.25 g/mol) was sourced from Sigma Aldrich (Cat. n°1399664V). Acid Gibberellic (C19H22O6; M.M. 346.37 g/mol) was purchased from Acros Organics (Cat. n°11936-0050).

1 ml of ethanol 98% was added to 1 g of each phytohormone, and stirred until absolute solubilization. 50 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (Wisent Inc, cat n◦ 219− 015-XK), was added and stored at +4 °C until use.

Determination of adequate phytohormone concentration

MTT assay

MTT assays were used to determine the appropriate concentration of each phytohormone. Growth effects of serial dilutions (from 1 to 1/1024) of the three phytohormones were determined by MTT assay. In this assay, soluble MTT was metabolized by mitochondrial enzyme activity of viable cells into an insoluble colored formazan product. Subsequently, formazan was dissolved in DMSO and measured spectrophotometrically at 540 nm. Briefly, 14,4 ml of cell suspension (4.104 cells/ml) were seeded in 96-well microplates (150 µl of cells/well). Decreasing dilutions of phytohormones (to give a final dilution of 1/1024) were added, and microplates were incubated (37 °C, 5% CO_2 air humidified) for 72 h. For the cell control (CTR), wells contained only cells in the media without phytohormones. To evaluate cell growth, 10 ml of MTT solution (5 mg/mL in PBS) was added to each well and incubated for 3 h. Then, gently, the medium containing MTT was replaced by DMSO and pipetted to dissolve any formed formazan crystals. Absorbance was then determined at 540 nm by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader. Each concentration was assayed in three wells and repeated three times.

Evaluation of the determined concentrations on cellular yields

A total of five concentrations of each phytohormone were selected after analysis of the MTT assay and tested on cells. In order to evaluate their effects on cellular yield and to choose the optimal

concentration for cellular growth. Vero and Heart cells were seeded (40 000 cells/cm2) in F25 cm2 and the three phytohormones were added separately. For control, flasks were seeded without phytohormones. Flasks were incubated at 37 °C, 5% CO_2 and air humidified for 3 days. Trypsinization was performed on the cells to determine the cellular yield.

Effect of phytohormones on cell viability

The optimal concentration of every phytohormone was repeated by another analyst for three times and the results obtained by MTT assay were used to calculate viability percentage using this following formula: % viability: 100 x (Ac – At)/ Ac; with at: Absorbance of test and Ac: Absorbance of control.

Phytohormones effects on Vero and Heart cells growth kinetics

Phytohormones effects on cell growth kinetics were evaluated over a period of 6 days. The daily cell density was evaluated by the Trypan Blue Exclusion method. Eighteen F25 cm2 were seeded with 40 000 cells/cm2 for Vero and Heart cells. Each phytohormone was added to 6 F25 cm2 with the concentrations already defined (1/128 for kinetin, 1/32 for acid Gibberellic, and 1/4 for Auxin). 3 F25 cm2 for each type of cell (phytohormone/F25 cm2) were trypsinized and 0.1 ml of cells were stained with 0.1 ml of 0.4% trypan blue. Cells were mixed gently and loaded quickly onto a hemocytometer to examine under a light microscope at low magnification. The total number of blue stained cells was counted.

Controls were seeded with the same cell concentration and without phytohormones.

Effect of phytohormones on cell morphology

Vero and heart cells (150 000 cells/ml) were seeded in 6 wells (2 ml/well), followed by phytohormones. The plates were incubated at 37 °C, 5% CO_2 (air humidified). After 24 h, the plates were stained according to the May Grünwald - Giemsa coloration technique. We covered the plates with diluted May Grünwald stain for 1 minute, then rinsed them with buffered distilled water and covered them with buffered water. We then let them rest for a few minutes. After 1 minute, diluted Giemsa (1/10) was added and left for 5 minutes. Finally, the plates were rinsed with buffered distilled water and allowed to air dry.

Statistical analyses

The student test was used to analyze the differences in cell growth assays. *P-values* > 0.05 were considered significant for all analyses.

Results

1. Determination of adequate phytohormone concentration

1.1. MTT assay results

MTT assay test shows that the appropriate concentration for Auxin is 1/2 to 1/32 for the two types of cells. As a result, Heart cells have an average increase in viability of 12,5% and Vero cells 16,2%. With Kinetin, concentrations range between 1/16 and 1/256, with an average induction rate of 44, 83% for Heart cells and 41, 55% for Vero cells. As for Gibberellin, concentrations that give better induction for Heart cells are from 1/32 to 1/512 with an average of 41, 76% and 1/16 to 1/256 for Vero cells with an average of 5 and 6% (Table 1).

1.1. Evaluation of the determinate concentrations on cellular yields

Based on MTT assays, five concentrations of each phytohormone were chosen for cellular yield testing. For both types of cells, 1/4 of Auxin significantly increased cell proliferation (80 000 cells/cm2 for Heart cells and 46 000 cells/cm2 for Vero cells). Same result is obtained for Gibberellin; 1/128 is the optimal concentration for cell development of the cells (increase by 100 000 cell/cm2 for Heart cells and 19 000 cell/cm2). For Kinetin 1/32 concentration gave the highest cellular yields for both Heart cells (an increase by 96 000 cell/cm2) and Vero cells (an increase by 30 000 cell/cm2) (Fig. 1).

2. Percentages of enhancement of cell viability by phytohormones

Table 2 explains the percentage of cell viability induction caused by phytohormones. Kinetin was responsible for the higher enhancement of Heart cells, but not Vero cells; this phytohormone produced the least effect. Gibberellin stimulated Vero cells and Heart cells with a small percentage difference. Accordingly, it promotes 23,25% viability in Heart cells, whereas 40,1% viability is enhanced in Vero cells.

3. Phytohormones effects on Vero and Heart cells growth kinetics

After cell incubation, cells begun to grow and cellular yield increased for cultures added with phytohormones and control. Figure 2 shows that the maximum cellular yield is achieved by culture added with Kinetin followed by Gibberellin, Auxin and then control at day 4. It is not the same for Vero cells; Gibberellin has the most positive effect on growth for these cells until day 4, after that Auxin also stimulate cellular multiplication like Gibberellin.

4. Effect of phytohormones on cell morphology

Figure 3 displays the influence of phytohormones on the cell morphology of Heart and Vero cells. For Vero cells, the difference in cell form is not very clear however, Auxin promotes cell elongation and extension for Heart cells. Furthermore, cell controls demonstrate dark spots that are indicative of cellular stress, which are not present in other cultures.

5. Effect of phytohormones on pH and Glucose consumption

In Heart cell culture the glucose was consumed the most when its added with Kinetin (6 g/l to 4,71 g/l) and pH decreased from 7,24 to 6,21 after four days of incubation. As for Vero cell culture the concentration of glucose decreased from 6 g/l to 4, 53 g/l when cells supplemented with gibberellin, the pH of the culture dropped from 7,3 to 6,14 after 6 days of incubation (Fig. 4 and table 3).

Discussion

Pharmacological activities of natural compounds are of significant interest. A group of small-molecule compounds that has not been investigated thoroughly yet is plant growth-regulating hormones**.** Plant hormones are biologically active substances of low molecular weight and diverse chemical composition. They are produced by plant cells and regulate many physiological processes, such as stress responses, stimulation or inhibition of plant development, and growth [13]**.** There has been considerable interest in the impact of phytohormones on mammalian cells in several studies.

Vero cells are the most used continuous mammalian cell line for the production of viral vaccines. Historically, it was the first cell line that was approved by WHO for the production of human vaccines [14]. It is also used for the production of most veterinary vaccines such as PPR [15].

Vaccines against Poxviruses are currently prepared using primary cells [16]. Rhazi et al. It was demonstrated that embryonic heart cells could be successfully used for the proliferation of three Capripoxviruses [17].

In this study the impact of Auxin, Gibberellin was tested to examine the behavior of Vero and Heart cells. For each type of cell, we first determined the optimal concentration of each phytohormone. This was done in two steps; a MTT assay was performed in order to determine the interval of adequate concentrations, then a cellular yield assay was performed to determine the concentration that produced the highest cell growth. MTT Results showed that there is a significant difference between the chosen concentrations and control. In addition, cellular yield comparison showed that the ideal concentration of Auxin for Vero and Heart cells is 1/4, 1/128 of Gibberellin and

1/32 of Kinetin. According to our results, phytohormones boost the viability of Heart cells more than Vero cells, and Kinetin (62, 38%) is the most potent stimulator of Heart cells in this study. Vero cells are most receptive to Gibberellin (44, 36%) because it stimulates their cell viability most strongly. The reason for this can be explained by the fact that the heart cells are primary cells, which are susceptible to hormones and are more permissive of them. C. WON et al, declare that in somatic cell NT embryos, kinetin increased the proportion of embryos developed to blastocysts from 7.5% to 15.4% [18]. Kinetics study demonstrated that the peak of cell growth of Heart cells is day 4 after incubation. This is followed by Gibberellin and then Auxin. At day 6, cellular yields in Vero cells continued to increase, with Auxin demonstrating the highest concentration, followed by Gibberellin and Kinetin. According to results obtained by Singh et al in 2018, they confirmed that Kinetin enhances cellular density more than Auxin for HEK293 and NIH3T3 mammalian cell lines [11]. However, in 2015 Valeria Cernaro et al proved that LLC-PK1 proliferation significantly increased, compared to control cells, 72 h after addition of auxin to cultured cells [19]. Kinetin and Gibberellin promote cell division and proliferation. It has been shown that kinetin is involved in the regulation of many aspects of growth and differentiation, including cell division, apical dominance, nutrient metabolism, and chloroplast development [20][21]. Historically Kinetin was originally described as a factor of cell division by promoting the synthesis of DNA repair enzymes, superoxide dismutase activity, and ribosomal RNA transcription [22] [23][24]. Patrick et al announced that Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis [25], and added in 2002 that this phytohormone promotes growth by stimulating destruction of the nuclear growth-repressing DELLA proteins [26]. Olszewski et al demonstrate that Gibberellin is a bioactive growth regulator. This is because it regulates a wide range of developmental processes such as trichome development [27]. The results of this study were supported by several previous reviews that described Gibberellin biosynthesis and catabolism pathways [28][29][30][31]. This increase in cell growth was indirectly confirmed by the consumption of glucose and the reduction of cell culture pH. Assay results showed that kinetin supplemented heart cells had the lowest pH and glucose concentration, followed by gibberellin and auxin. For Vero cells, the values dropped for the culture supplemented with Gibberellin followed by Kinetin and Auxin. Low pH can be a cell culturing limitation however, it's can be resolved by the addition of pH buffer in the beginning of the incubation. Our assay also showed that phytohormones have a positive effect on cell morphology. This effect is observed especially after

the addition of Auxin. We found out that this hormone expands cells and gives them a particular shape. This plant hormone is well known to stimulate cell elongation via increasing wall extensibility. It participates in the regulation of cell wall properties by inducing wall loosening which is confirmed by different studies [32] [33] [34] [35] [36]. The control showed cellular stress, which was not observed in other cell cultures. Research has shown that phytohormones reduce cellular stress due to their antioxidant properties [37][38][39][40]. In 2016 Eman et *al*. Demonstrate that kinetin confers protection on cells against oxidative stress. Their results show that pretreatment of cells with kinetin significantly reduces 4-nitroquinoline 1-oxide-mediated reactive oxygen species production [41]. The observation that phytohormones can be involved in the regenerative process also in mammalian cells is challenging, and opens new scenarios in the field of vaccine production. In conclusion, the preliminary results we report about the proliferative effects of the plant hormones on Vero and Heart cells may stimulate a new line of research aiming at investigating the impact of those hormones on other cell lines, and their influence on several cell passages. In addition, further studies should be carried out to determine whether they affect virus propagation and multiplication during the antigen production process and their industrial feasibility. Kinetics study demonstrated that the peak of cellular growth of Heart cells is day 4 after incubation with the highest cellular yield using Kinetin followed by Gibberellin and then Auxin. As for Vero cells cellular yields continues to increase until day 6 where Auxin highest cell concentration followed by Gibberellin and Kinetin. Same results obtained by Singh et al in 2018, they confirmed that Kinetin enhance cellular density more than Auxin for HEK293 and NIH3T3 mammalian cell lines [11].

However, in 2015 Valeria Cernaro et al proved that LLC-PK1 proliferation significantly increased, compared to control cells, 72 h after addition of auxin to cultured cells [19].

Kinetin and Gibberellin promotes cell division and proliferation. It has been shown that kinetin is involved in the regulation of many aspects of growth and differentiation, including cell division, apical dominance, nutrient metabolism, chloroplast development [20][21]. Historically Kinetin was originally described as a factor of cell division by promoting synthesis of DNA repair enzymes, superoxide dismutase activity, and ribosomal RNA transcription [22] [23][24].

Patrick et al announced that Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis [25], and added in 2002 that this phytohormone promotes growth by stimulating destruction of the nuclear growth-repressing DELLA proteins [26]. Olszewski et al demonstrate that

Gibberellin is a bioactive growth regulator, that control such diverse developmental processes such as trichome development [27], the results of this study were supported by several previous reviews that described Gibberellin biosynthesis and catabolism pathways [28][29][30][31].

This increasing of cell growth was proven indirectly by the consummation of glucose and the reduction of cell culture pH. Our assay demonstrate that pH and glucose concentration of Heart cells were the lowest when the culture is supplemented with kinetin followed by Gibberellin and Auxin. For Vero cells, the values dropped for the culture supplemented with Gibberellin followed by Kinetin and Auxin. Low pH can be a cell culturing limitation however, it's can be resolved by the addition of pH buffer in the beginning of the incubation.

Our assay also showed that phytohormones have a promotive effect on cell morphology which is observe especially after the addition of Auxin, we found out that these hormones expand cells and gave them a particular shape, this plant hormone is well known to stimulate cell elongation via increasing wall extensibility. Its participates in the regulation of cell wall properties by inducing wall loosening which is confirmed by different studies [32] [33] [34][35] [36]. The control showed cellular stress, which is not observed with other cell cultures. Large number of research proved that phytohormones have the ability to reduce cellular stress due to their antioxidant effect [37][38][39][40]. In 2016 Eman et al. demonstrate that kinetin confer protection in cells against oxidative stress. Their results show that pretreatment of the cells with kinetin significantly reduces 4-nitroquinoline 1-oxide mediated reactive oxygen species production [41].

The observation that phytohormones can be involved in the regenerative process also in mammalian cells is challenging, and opens new scenarios in the field of vaccine production.

In conclusion, the preliminary results we report about the proliferative effects of the plant hormones on Vero and Heart cells may stimulate a new line of research aiming at investigating the impact of those hormones on other cell lines, and their influence on several cell passage. In addition, further studies should be carried out on whether they affecting virus propagation and multiplication during antigen production process and their industrial feasibility.

References

[1] P. J. Davies, “A1 . The Plant Hormones : Their Nature ,” no. January 2010, 2014, doi: 10.1007/978-1-4020-2686-7.

[2] “Gibberellins,” p. 24.

[3] P. Biology, “Phytohormones and Growth Regulators,” 2009.

[4] F. W. Went, “Cati [ornia Institute o [Technology,” no. 48, pp. 162–182.

[5] E. A. Dun *et al.*, “Strigolactone inhibition of shoot branching,” vol. 455, no. September, 2008, doi: 10.1038/nature07271.

[6] M. E. Studham and G. C. Macintosh, “Phytohormone signaling pathway analysis method for comparing hormone responses in plant-pest interactions,” 2012.

[7] A. Vande Broek *et al.*, “of the Azospirillum brasilense Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Gene and Identification of a cis -Acting Sequence Involved in Auxin Responsive Expression,” vol. 18, no. 4, pp. 311–323, 2005.

[8] P. Regeneration, “Effect of Auxins and Cytokinins on Efficient Plant Regeneration and Multiple-Shoot Formation from Cotyledons and Cotyledonary-Node Explants of Groundnut (Arachis hypogaea L .) by In Vitro Culture Technology,” vol. 67, 1997.

[9] P. Signaling, “Gibberellic acid in plant Still a mystery unresolved,” vol. 2324, 2013, doi: 10.4161/psb.25504.

[10] Í. È. Îïóõîëåâûõ, Ê. Åëîâåêà, Ì. Ñ. Âèëüàíîâà, Ì. À. Ñàâèöêàÿ, Ã. Å. Îíèùåíêî, and Å. À. ñìèðíîâà, “äåéñòâèå ðàñòèòåëüíûõ ãîðìîíîâ íà êîìïîíåíòû ñåêðåòîðíîãî ÏÓÒÈ,” 2014.

[11] D. K. Singh, A. Shukla, and S. Dixit, “Impact of phytohormones auxin and cytokinin on mammalian cells,” vol. 8, no. 2, pp. 7–12, 2018.

[12] M. S. Vildanova, M. A. Savitskaya, G. E. Onishchenko, and E. A. Smirnova, “The Effect of Plant Hormones on the Components of the Secretory Pathway in Human Normal and Tumor Cells,” vol. 8, no. 5, pp. 407–415, 2014, doi: 10.1134/S1990519X14050095.

[13] S. Gazzarrini and A. Y.-L. Tsai, “Hormone cross-talk during seed germination,” *Essays Biochem.*, vol. 58, pp. 151–164, Sep. 2015, doi: 10.1042/bse0580151.

[14] S. Kiesslich and A. A. Kamen, “Jo ur l P re of,” *Biotechnol. Adv.*, p. 107608, 2020, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107608.

[15] M. D. Baron, A. Diallo, R. Lancelot, and G. Libeau, *Peste des Petits Ruminants Virus*, 1st ed., vol. 95. Elsevier Inc., 2016.

[16] S. Babiuk *et al.*, “Journal of Veterinary Diagnostic,” 2007, doi: 10.1177/104063870701900505.

[17] H. Rhazi, N. Safini, K. Mikou, M. Alhyane, and M. Lenk, “Comparative sensitivity study of primary cells , vero , OA3 . Ts and ESH-L cell lines to lumpy skin disease , sheeppox , and goatpox viruses detection and growth,” *J. Virol. Methods*, vol. 293, no. April, p. 114164, 2021, doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114164.

[18] C. Won, S. K. Park, S. Cho, B. Min, and S. Roh, “Kinetin Enhances In Vitro Development of Parthenogenetic and Nuclear Transfer Porcine Embryos,” vol. 1709, no. July 2007, pp. 1701–1709, 2008, doi: 10.1002/mrd.20920.

[19] V. Cernaro *et al.*, “Auxin induces cell proliferation in an experimental model of mammalian renal tubular epithelial cells Auxin induces cell proliferation in an experimental model of mammalian renal tubular epithelial cells,” no. February, 2015, doi: 10.3109/0886022X.2015.1015683.

[20] J. E. Davey and J. van Staden, “Cytokinin Activity in Lupinus albus L. IV. Distribution in Seeds,” *Plant Physiol.*, vol. 63, no. 5, pp. 873–877, Mar. 1979, [Online]. Available: http://www.jstor.org/stable/4265762.

[21] S. Perilli, L. Moubayidin, and S. Sabatini, “The molecular basis of cytokinin function,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 21–26, 2010, doi: https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.018.

[22] c. o. miller, f. skoog, m. h. von saltza, and f. m. strong, “Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid1,” *j. am. chem. soc.*, vol. 77, no. 5, p. 1392, mar. 1955, doi: 10.1021/ja01610a105.

[23] R. Guttman, “Effects of kinetin on cell division, with special reference to initiation and duration of mitosis,” *Chromosoma*, vol. 8, no. 1, pp. 341–350, 1956, doi: 10.1007/BF01259506.

[24] J. R. Sheu *et al.*, “Inhibitory mechanisms of kinetin , a plant growth-promoting hormone , in platelet aggregation,” pp. 189–196, 2003, doi: 10.1080/0953710021000060925.

[25] P. Achard *et al.*, “Report Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis,” *Curr. Biol.*, vol. 19, no. 14, pp. 1188–1193, 2009, doi: 10.1016/j.cub.2009.05.059.

[26] P. Achard, J. Renou, R. Berthome, N. P. Harberd, and P. Genschik, “Report Plant DELLAs Restrain Growth and Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species,” pp. 656–660, 2008, doi: 10.1016/j.cub.2008.04.034.

[27] N. Olszewski, T. Sun, and F. Gublerc, “and Signaling : Gibberellin Response Pathways,” vol. 14, no. 2002, 2015.

[28] T. Lange, “Review Molecular biology of gibberellin synthesis,” no. May, 2014, doi: 10.1007/s004250050274.

[29] Y. Kamiya and J. L. García-Martínez, “Regulation of gibberellin biosynthesis by light.,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 2, no. 5, pp. 398–403, Oct. 1999, doi: 10.1016/s1369-5266(99)00012-6.

[30] P. Hedden and A. L. Phillips, “Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes.,” *Trends Plant Sci.*, vol. 5, no. 12, pp. 523–530, Dec. 2000, doi: 10.1016/s1360-1385(00)01790-8.

[31] S. Yamaguchi, Y. Kamiya, and T. Sun, “Distinct cell-speci ® c expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during Arabidopsis seed germination,” vol. 28, pp. 443–453, 2001.

[32] M. Majda, “The Role of Auxin in Cell Wall Expansion,” 2018, doi: 10.3390/ijms19040951.

[33] C. Cookson, D. J. Osborne, C. Cookson, and D. J. Osborne, “Linked references are available on JSTOR for this article : Planta The Stimulation of Cell Extension by Ethylene and Auxin in Aquatic Plants,” vol. 144, no. 1, pp. 39–47, 2016.

[34] R. A. C. Expansion, “HHS Public Access,” no. 46, pp. 379–402, 2021, doi: 10.1146/annurev-arplant-073019-025907.Rapid.

[35] R. E. Cleland, “Evidence that Auxin-induced Growth of Soybean Hypocotyls Involves Proton Excretion1,” vol. 66, no. 3, pp. 433–437, 2016.

[36] J. T. Lowery and A. Arbor, “CELL WALL SYNTHESIS AND CELL ELONGATION IN OAT COLEOPTILE TISSUE !,” vol. 49, no. 1934, pp. 342–347, 1961, doi: 10.1002/j.1537-2197.1962.tb15031.x.

[37] N. Gougoulias, “Effect of some phytohormones on polyphenols content and antioxidative activity of grape of mavrud variety (Vitis vinifera L .) Effect of Some Phytohormones on Polyphenols,” no. January 2011, 2015.

[38] P. Taylor, “Effects of phytohormones on proline content and antioxidant enzymes of various wheat cultivars,” no. may 2012, pp. 37–41, doi: 10.1080/01904167.2012.671411.

[39] A. Abdel and H. Abdel, “Interaction of salinity and phyohormones on antioxidant enzymes of two roselle cultivars,” no. January 2006, 2015.

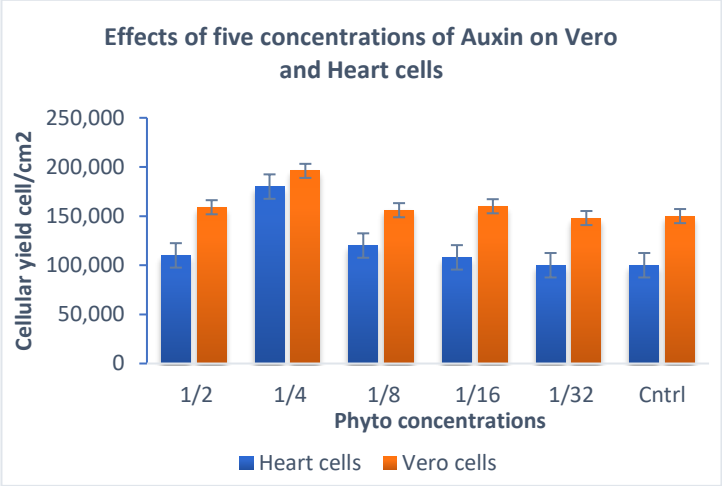
[40] V. Kumar, “Effect of Iron and Phytohormones Application on Antioxidant Enzymes Activity , Chlorophyll and Grain Yield of Maize in Iron-deficient Soil,” vol. 39, no. 5, pp. 100–109, 2020, doi: 10.9734/CJAST/2020/v39i530551.

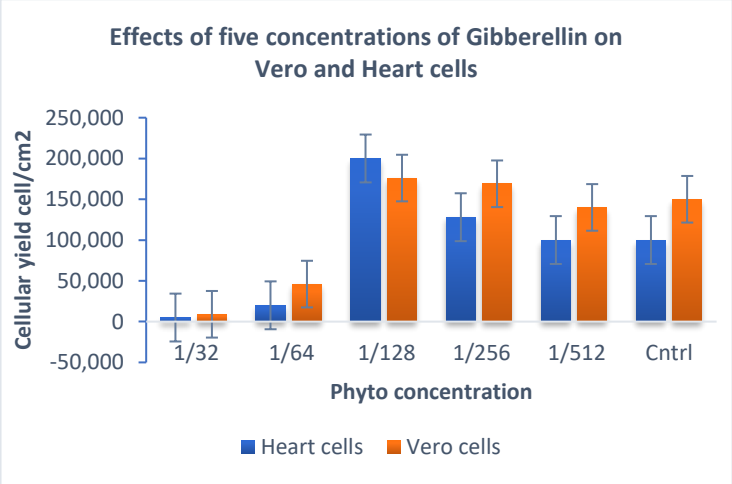
[41] E. M. Othman, M. Naseem, E. Awad, and T. Dandekar, “The Plant Hormone Cytokinin Confers Protection against Oxidative Stress in Mammalian Cells,” pp. 1–14, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0168386.

Figure Captions

1. Evaluation of the determinate concentrations on cellular yields

Figure 1 is representing the effect of the five hormones on Vero and Heart cells proliferation.





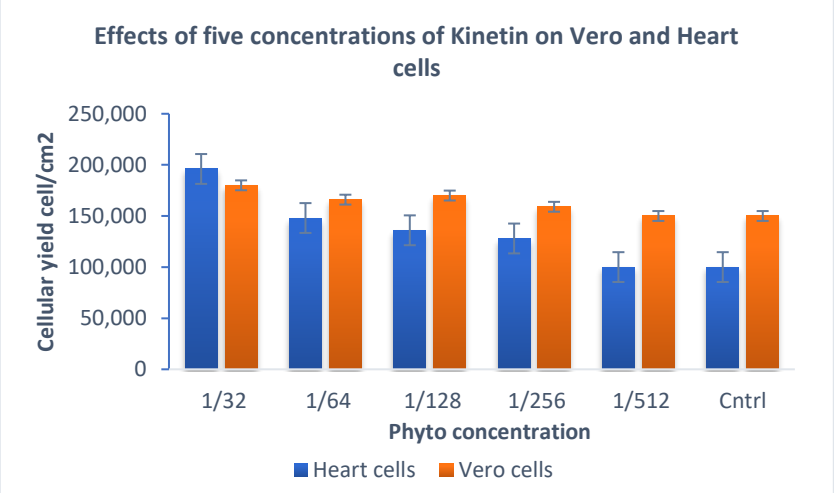
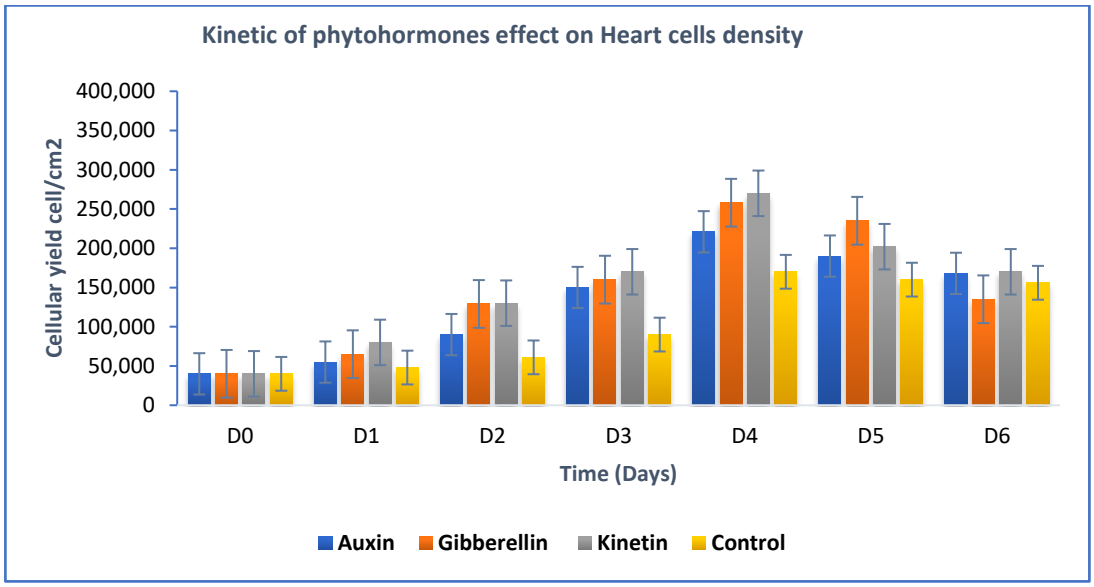


Figure 1. Effect of the optimal concentration of Auxin, Gibberellin and Kinetin on Heart and Vero cell

2. Phytohormones effects on Vero and Heart cells growth kinetics

Figure 2 shows the response of the two types of cells to Kinetin, Gibberellin, and Auxin.



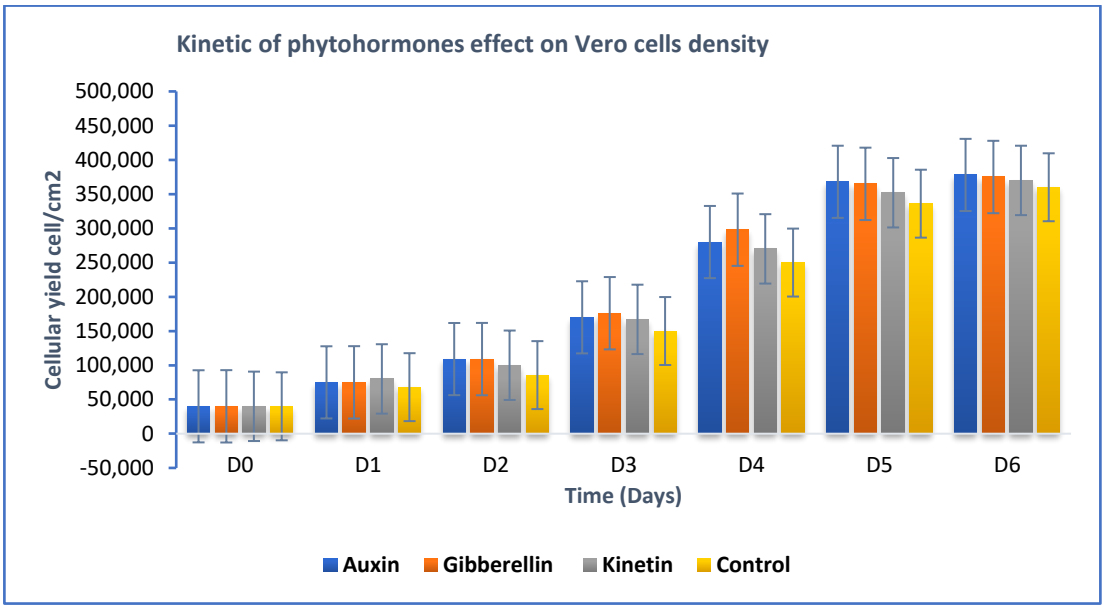


Figure 2. Effect of phytohormones on Heart and Vero cells growth kinetics

3. Effect of phytohormones on cell morphology

Figure 3 displays the influence of phytohormones on the cell morphology of Heart and Vero cells.

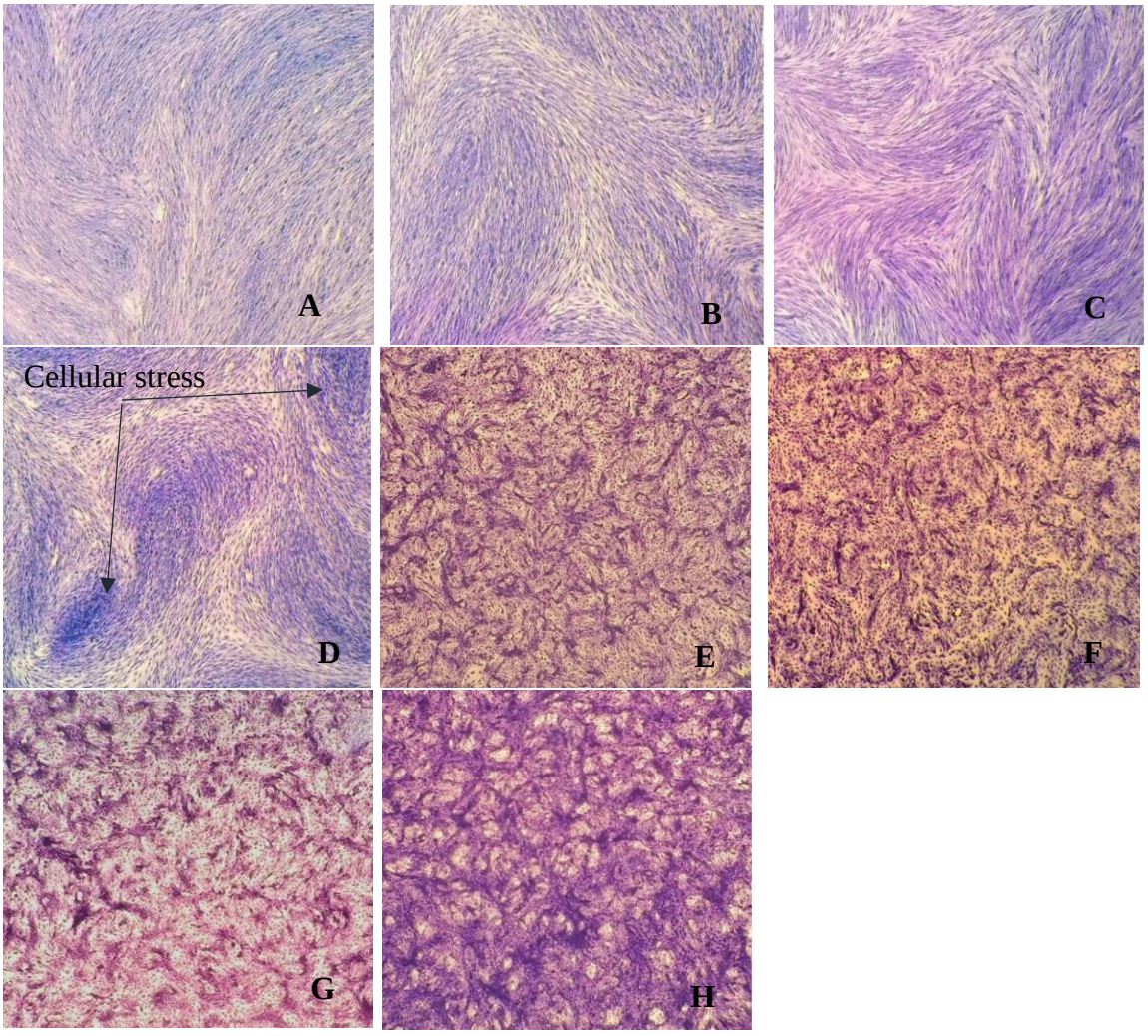


Figure 3. Effect of Kinetin (A, E), Gibberellin (B, F) and Auxin (C, G) on Heart and Vero cells. D: control of Heart cells, H: Control of Vero cells

4. Effect of phytohormones on pH and Glucose consumption

Figure 4 is displaying the differences in glucose values during the time of incubation of Vero and Heart cells.

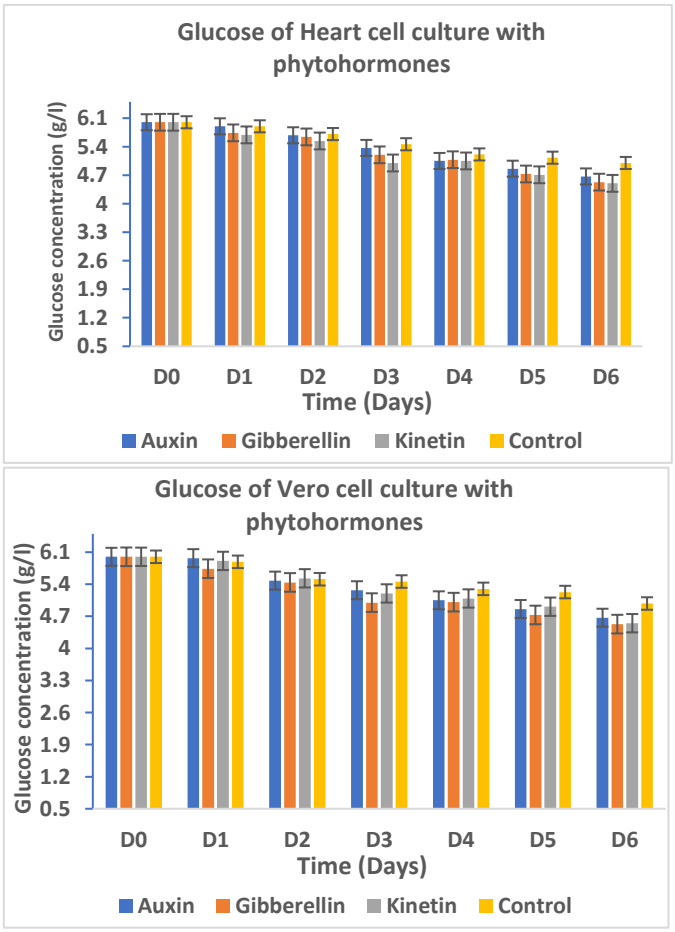


Figure 4. Glucose of Vero and Heart cell cultures with phytohormones

Tables

Table 1. MTT assay results of Heart and Vero cell cultured with different concentration of phytohormones

	Heart cells			Vero cells		
Dilutions	**A**	**K**	**G**	**A**	**K**	**G**
1	0,84	0,96	0,14	0,292	0,303	0,087

½	0,871	0,742	0,04	0,315	0,37	0,069
¼	0,986	1,064	0,448	0,398	0,361	0,077
1/8	0,903	1,056	0,956	0,327	0,37	0,185
1/16	0,873	1,137	1,045	0,309	0,39	0,291
1/32	0,869	1,118	1,299	0,301	0,403	0,297
1/64	0,847	1,211	1,239	0,29	0,409	0,284
1/128	0,814	1,216	1,264	0,254	0,41	0,327
1/256	0,804	1,111	1,178	0,256	0,398	0,295
1/512	0,805	1,101	1,108	0,204	0,302	0,208
1/1024	0,798	0,987	1,001	0,199	0,219	0,169
Control	0,800			0,284		

***A**: Auxin, **K:** Kinetin, and **G**: Gibberellin

Table 2. Cell viability enhancement by the three phytohormones

Cells	Auxin	Gibberellin	Kinetin
Heart cells	23,25 %	52 %	62,38 %
Vero cells	40,1 %	44,36%	15,4 %

Table 3. pH of Vero and Heart cell cultures with phytohormones

Time	pH of Vero cell culture				pH of Heart cell culture			
	Auxin	Gibberellin	Kinetin	Control	Auxin	Gibberellin	Kinetin	Control
D0	7,37	7,26	7,3	7,23	7,28	7,18	7,24	7,19
D1	7,22	7,14	7,14	7,18	7,2	7,13	7,1	7,14
D2	6,68	6,75	6,78	6,62	6,88	6,79	6,66	6,58
D3	6,48	6,51	6,5	6,42	6,75	6,63	6,4	6,39

D4	6,4	6,39	6,27	6,36	6,48	6,36	6,21	6,18
D5	6,34	6,23	6,25	6,28	6,22	6,16	6,11	6,09
D6	6,29	6,14	6,22	6,19	6,16	6,11	6,02	6,00

Chapitre III : Evaluation de l'efficacité des vaccins des Capripoxvirus

Cette partie de la thèse a donné lieu à une publication dans le journal **Immunological Methods**

Evaluation of ELISA and VNT for Sheeppox virus antibody detection and development of an immunoenzymatic quantitative method

Doi: https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113226

Chapitre III : Evaluation de l'efficacité des vaccins des Capripoxvirus

SPPV, GTPV et LSDV causent des maladies à déclaration obligatoire des bovins, ovins et caprins, respectivement. Ces agents sont des virus appartenant au Genre Capripoxvirus de la famille des Poxviridae. Ils sont économiquement importants car ils provoquent de la fièvre, une émaciation, une perte de poids, une baisse de la production de lait et des lésions cutanées.

Pour éradiquer les virus CaPVs la vaccination de tous les animaux sensibles est considérée comme le moyen principal, soutenue par d'autres mesures de contrôle telles que l'abattage sanitaire, les restrictions de mouvement des animaux, la quarantaine et la désinfection [277]. Des études immunologiques, pour le suivi de la vaccination des CaPVs, ont montré que celle-ci stimule à la fois l'immunité humorale et la médiation cellulaire [283]. L'immunité humorale, assurée par la production d'anticorps, peut être étudiée à l'aide d'un grand nombre de tests tels que le test de séroneutralisation du virus (VNT), le test d'immunofluorescence indirecte (IFA) et le test ELISA [3]. D'autres tests immunologiques sont également utilisés comme le test d'agglutination au latex, ainsi que le test d'immunodiffusion sur gel d'agar et le Western blot. Cependant ; ces tests ont montré une faible sensibilité de détection des anticorps [13]. A ce jour, la VNT est le seul test sérologique, validé par l'OMSA, comme étant un test à haute spécificité pour la détection des anticorps spécifiques du Capripoxvirus [167].

L'objectif de cette étude est de définir une méthode spécifique et sensible pour la détection et la quantification de la réponse immunologique à la vaccination par les vaccins anti-CaPVs.

Pour se faire, nous avons commencé d'abord par la comparaison de la sensibilité du kit commercial ELISA avec la VNT. Nous avons, par la suite, comparé les résultats de la méthode VNT sur différents types de cellules : les cellules testiculaires (LT), la lignée cellulaire Ovine Aries Testis (OA3.Ts) et la lignée cellulaire ESH-L. Enfin, une comparaison de trois techniques de révélation de la VNT est réalisée. Ces trois techniques de révélation sont la présence ou l'absence d'effet cytopathique, le test d'immunoperoxidase (IPMA) et le test d'immunofluorescence (IFA).

Deux cent vingt sérums ont été prélevés sur des moutons au Maroc. Des échantillons de sang ont été prélevés au hasard sur des races locales, mâles et femelles de tout âge, dans le cadre du suivi

post-vaccinal du SPPV. L'échantillonnage a été effectué conformément aux principes des bonnes pratiques vétérinaires et dans le plein respect du bien-être animal, y compris des animaux témoins non vaccinés et des animaux vaccinés à différents intervalles de temps après la vaccination. Le sang a été recueilli dans des tubes secs, laissé coaguler pendant 3 h à température ambiante, puis les sérums ont été extraits par centrifugation à 2000 tr/min pendant 20 min, transférés dans des tubes de 2 ml et conservés à - 20 ◦C jusqu' à l'analyse.

La détection des anticorps par le test ELISA a été réalisée à l'aide d'ID Screen®, Capripox double antigen Kit ELISA multi-espèces de ID vet® (Montpellier, France) selon les instructions du fabricant. Les échantillons et les contrôles sont répartis dans des puits, formant un complexe antigène-anticorps. Les plaques sont ensuite lavées et le conjugué (antigène CPV purifié marqué à la peroxydase (HRP) est ajouté dans les puits. Après élimination de l'excès du conjugué, la réaction est révélée par une solution de tétraméthylbenzidine (TMB). En présence d'anticorps dans l'échantillon, une coloration bleue apparaît qui devient jaune après blocage. Cependant, en l'absence d'anticorps dans les échantillons, aucune coloration n'apparaît. La lecture des plaques est effectuée à 450 nm.

Le sérum de mouton a été analysé à l'aide de VNT pour déterminer le titre d'anticorps SPPV.

Les sérums ont été chauffés à 56◦C pendant 30 min. une série de dilutions (de 1/3 à 1/729) a été réalisée dans un milieu de culture cellulaire additionné de 1% de sérum bovin fœtal (SVF). Pour chaque sérum, 4 répétitions sont effectuées.

Le virus utilisé dans ce travail est la souche atténuée SPPV Romania. Une monocouche de cellules LT a été infectée par un MOI de 0,01, et incubé à 35◦C. Après 80 % de CPE, le ballon a été congelé et décongelé puis aliquoté et stocké à − 80 ◦C jusqu'à utilisation. La suspension virale a été soumise à un titrage pour déterminer le titre infectieux à utiliser en VNT. Une suspension de 100 TCID50 a été ajoutée dans le puits de 96 plaques contenant la dilution en série du sérum à volume égal (25 µl) et incubé pendant 1 h à 37 ◦C et 5% de CO_2. Trois dilutions du virus, après 10 jours d'incubation, ont été préparées et distribuées en 10 lots. Chaque lot est placé dans la plaque de contrôle du virus composée de 25 µl de virus et 25 µl de milieu.

A côté des cellules primaires de testicule d'agneau (LT), deux lignées cellulaires supplémentaires ont été utilisées dans le VNT pour l'évaluation de la sensibilité : OA3.Ts et ESH-L. Les deux lignées cellulaires étaient cultivées dans le milieu d'Eagle modifié de Dulbecco complété par 10 % de FBS. Pour chaque type de cellule, une suspension (120 000 cellules/cm^2) a été préparée

et ajoutée aux plaques incubées à un volume de 150 µl. Le contrôle est composé de 150 µl de cellules sans virus ni sérum.

Toutes les plaques ont été incubées pendant 6 jours à 37 ◦C pour la détection de CPE. Un puits est considéré comme négatif lorsqu'un CPE typique est observé. Dans l'absence de CPE, le virus est considéré comme neutralisé et le puits est positif. Le titre en anticorps a été calculé selon la méthode de Reed & Muench.

Cinquante sérums à forts titres positifs et 50 sérums à faibles titres par ELISA et VNT ont été utilisés pour comparer les méthodes VNT, IPMA et IFA.

Les tests IPMA ont été réalisés comme décrit par Haegeman [55]. Après trois jours d'incubation de plaques contenant des virus, du sérum et des cellules, les plaques ont été fixées avec du paraformaldéhyde et colorées en utilisant comme anticorps spécifique l'anti-Sheep IgG-peroxydase. L'observation au microscope à contraste inversé caractérise les puits positifs comme des monocouches non colorées et les puits négatifs comme des puits colorés en rouge.

Pour le test IFA, la lecture des puits de plaque a été effectuée à l'aide d'un microscope IF inversé après addition d'un anticorps anti-SPPV et d'un colorant fluorescent anti-souris de lapin 594. Le signal de fluorescence a été analysé à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus. Les puits qui affichent des foyers fluorescents ont été désignés négatifs. Et les cellules qui ne montrent aucune fluorescence ont été considérées comme positives.

Les différences entre les titres d'anticorps obtenus par les différents types de tests sérologiques ont été comparées par la méthode de Fisher. Pour les valeurs de $p \leq 0,01$ les différences sont considérées comme significatives.

Pour déterminer la spécificité et la sensibilité de l'ELISA, nous avons utilisé VNT comme la méthode de référence. Nous avons déterminé les vrais positifs (TP) (ELISA positif et VNT positif), faux positifs (FP) (ELISA positif et VNT négatif), faux négatifs (FN) (ELISA négatif et VNT positif) et vrais négatifs (TN) (VNT ELISA et VNT négatif). Les formules utilisées étaient : TP/ (TP + FN) * 100 pour la sensibilité, et

TN/ (FP + TN) * 100 pour la spécificité.

Les résultats ont montré que la VNT est plus sensible que l'ELISA puisque 22 % des sérums testés positifs étaient négatifs par ELISA. De plus, les sérums faiblement positifs par VNT étaient soit négatifs soit douteux par ELISA.

Dans notre étude, la comparaison de sensibilité entre les trois types cellulaires confirme que les ESH-L sont plus pratiques pour effectuer le test VNT puisque le titre global d'anticorps obtenu sur celles-ci est supérieur au titre sur les cellules LT ou OA3.Ts, les effets cytopathiques peuvent être détectés plus tôt, et l'effet est plus clair et spécifique au SPPV. La lecture finale de la plaque dure jusqu'à 9 jours dans la méthode OMSA sur les cellules testiculaires, alors qu'elle est de 6 jours sur les cellules OA3.Ts et de 4 jours seulement par la même technique sur ESH-L, ce qui est un grand avantage.

Pour améliorer la VNT, nous avons introduit une nouvelle méthode basée sur l'utilisation de sérum anti-SPPV, ce qui augmente la spécificité au test. Les résultats obtenus ont démontré que la technique IPMA est plus sensible que la méthode standard de l'OMSA (titre d'anticorps 2,5 contre 1,9). La méthode est spécifique ne détectant que le virus cible ; de plus, les résultats peuvent être obtenus en 3 jours contre 9 jours dans la méthode VNT.

L'IFA est également une méthode spécifique qui a été utilisée dans notre étude pour détecter et quantifier les anticorps anti-SPPV. Le nombre des sérums qui ont été testés positifs par IFA étaient beaucoup plus élevés que les sérums testés par VNT (2,4 contre 1,9).

Nous avons conclu que la meilleure méthode de détection et de quantification des anticorps anti-SPPV reste le test de neutralisation du virus. ELISA commercial a montré une faible sensibilité pour SPPV par rapport à la VNT. L'utilisation de cellules primaires pour VNT est une opération lourde et chronophage et pourrait être avantageusement remplacée par des cellules ESH-L. La technique de révélation immunoenzymatique, basée sur le sérum anti-SPPV, a ajouté une spécificité au VNT. En outre, l'IFA semble être aussi sensible que l'IPMA mais nécessite des réactifs et un appareillage coûteux (anticorps conjugués, microscope IF), de plus la lecture pourrait être influencée par l'opérateur.

Journal of Immunological Methods 502 (2022) 113226

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Immunological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jim

Evaluation of ELISA and VNT for sheeppox virus antibody detection and development of an immunoenzymatic quantitative method

Halima Rhazi [a,b,*], Karima Mikou [a], Youness Sadeqy [b], Meryeme Alhayane [b], Soufiane El Mejdoub [b], Najete Safini [b], Matthias Lenk [c], Khalid Omari Tadlaoui [b], Mehdi Elharrak [b]

[a] Laboratory of functional and environmental ecology, Faculty of Sciences and Techniques, Sidi Mohammed Ben Abdellah University, BP 2202 Imouzzer Road, Fez, Morocco
[b] Laboratory of Research and Development virology, MCI Animal Health, Lot. 157, Zone Industrielle Sud-Ouest (ERAC) B.P: 278, Mohammedia 28810, Morocco
[c] Departement of Experimental Animal Facilities and Biorisk Management, Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Sheep poxvirus
Immunoenzymatic technics
Immunoperoxidase assay
Immunofluorescence assay
ELISA
Antibody detection

ABSTRACT

Vaccination against sheep pox (SPV) is the most efficient tool to control spread of the disease and virus neutralization test (VNT) is the gold standard for vaccination monitoring. In the presented study, we evaluated the use of ELISA and VNT for quantification of SPV humoral response post vaccination. Results confirmed that VNT is more sensitive since ELISA did not detect 22% of positive tested sera, and VNT weak positive sera were either negative or doubtful by ELISA. The most sensitive cells to perform VNT were ESH-L instead of Lamb primary cells. We also investigated immunoperoxidase IPMA and immunofluorescence IFA assays for detection of SPV specific antibodies and IPMA showed higher antibody titers comparatively to IFA. VNT using ESH-L cells with immune-enzymatic revelation provide specific quantitative SPV antibody titers, easier to read in shorter incubation time.

1. Background

Sheep pox is a devastating and contagious disease of sheep characterized by pyrexia, generalized skin and internal pox lesions, and lymphadenopathy (Beard and Kingdom, 2019). The diseases is caused by sheep poxvirus (SPPV), which are enveloped, double-stranded DNA viruses, classified in Capripoxvirus genus of the Poxviridae family (Bhanuprakash et al., 2006). SPPV occur in Africa, Middle East, and Asia including India and China, causing high morbidity (70–90%) and mortality up to 50% leading to important economical losses (Rao and Bandyopadhyay, 2000). For successful SPPV control, vaccination of all susceptible animals is considered the main pillar, supported by other control measures such as stamping out, animal movement restrictions, quarantine and disinfection (Tuppurainen et al., 2017). Vaccination is the most effective way to control the spread of SPPV, only live attenuated vaccines are currently used. Immunological studies for SPPV vaccination monitoring has shown that vaccination stimulates both humoral and cell-mediated immunity (Varshovi et al., 2021). Humoral immune response can be investigated by using virus neutralization test (VNT), indirect fluorescent antibody test (IFA) and ELISA (Gari et al., 2008; Office International des Epizooties, 2017) and other immunological tests such include CIE, and latex agglutination test, also agar gel immunodiffusion test and Western blot. However; they have shown low sensitivity (Chand et al., 1994; Shankar and Yadav, 1988; Jenson, 2014). So far, VNT is the only serological test validated by the OIE with high specificity for detecting capripoxvirus-specific antibodies (Edition, 2008).

In this study, we evaluated and compared the performances of the detection of SPPV specific antibody by different serological tests. Our work is divided into three parts:

- Comparative sensitivity study of ELISA commercial kit with VNT OIE reference method, investigation carried out on 220 sera.

* Corresponding author at: Laboratory of functional and environmental ecology, Faculty of Sciences and Techniques, Sidi Mohammed Ben Abdellah University, BP 2202 Imouzzer Road, Fez, Morocco.
E-mail address: h.rhazi@mci-santeanimale.com (H. Rhazi).

https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113226
Received 1 October 2021; Received in revised form 29 November 2021; Accepted 10 January 2022
Available online 13 January 2022
0022-1759/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

- Comparative study of VNT reference OIE method using testis cells (LT), Ovine Aries Testis (OA3.Ts) cell line and Embryonic Skin of sheep (ESH-L) cells, to determine cell sensitivity, investigation performed on 106 sera.
- Comparative investigation on the VNT revelation method, where 100 of weak and strong positive sera have been analyzed by VNT and sera titers by three methods; cytopathic effect presence or absence (OIE standard method), immunoperoxidase assay (IPMA) and immunofluorescence assay (IFA) both using specific antibodies.

The aim of the study is to propose a specific and sensitive method for the detection of antibody response to SPPV infection or vaccination.

2. Material and methods

2.1. Blood samples

For this study, 220 serum were collected from sheep in Morocco. Blood samples were taken randomly from local breeds, male and female of all ages, within the frame of post vaccination monitoring for SPPV. Sampling was performed in line with principles of good veterinary practices and in full respect of animal welfare, including unvaccinated control and vaccinated animals at different intervals of time after immunization. Blood were collected into dry tubes, allowed to clot for 3 h at room temperature, and then sera were extracted by centrifuging at 2000 rpm for 20 min, transferred in 2-ml tubes and stored at −20 °C until analysis.

2.2. Serological analysis by ELISA

Antibody detection by ELISA test was performed using ID Screen® Capripox double antigen Multi-species ELISA kit from ID vet® (Montpellier, France) according the manufacturer's instructions. Briefly, the samples and the controls are distributed in the wells, forming an antigen-antibody complex. The plates are then washed and the conjugate (purified CPV antigen labeled with peroxidase (HRP)) is added to wells. After elimination of the excess conjugate, the reaction is revealed by a tetramethylbenzidine (TMB) solution. In the presence of antibodies in the sample, a blue color appears which becomes yellow after blocking. However, in the absence of antibodies in the samples, no staining appears. The reading is performed at 450 nm.

2.3. Serological analysis by VNT

Sheep serum were analyzed using VNT to determine SPPV antibody titer. This method was based upon the OIE Terrestrial Manual Chapter 3.7.12. The test was performed in 96-microwell plates (Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA):

- Serum preparation: Sera were heated at 56 °C for 30 min. A 3-fold dilution series was made in cell culture media (Dulbecco's modified Eagle's medium (Wisent Inc., cat n° 219–015-XK) supplemented with 1% Fetal Bovine Serum (FBS)) from the dilution 1/3 to 1/729 in 4 duplicates for each serum.
- Work virus: attenuated SPPV Romania strain (Precausta et al., 1979) (Causta and Kato, 1979) was used in VNT. A monolayer of LT cells in T75 flasks (Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA) was infected with a MOI of 0,01, and incubated at 35 °C. After 80% CPE, the flask was frozen and thawed, aliquoted and stored at −80 °C until use. The viral suspension was submitted for titration 5 times to determine the infectious titer to be used in VNT. A suspension of 100 TCID50/well was prepared for the test. The suspension was added in the 96 well plates containing the serum serial dilution at equal volume (25 µl) and incubated 1 h at 37 °C, 5% CO2. Three 10-fold dilutions of the work virus were prepared and distributed in 10 replicates each in the virus control plate (25 µl of virus +25 µl medium).
- Cells: Primary lamb testis cells LT were obtained by castration of a healthy three-month-old male. The tissue was cut into small pieces, and submitted to enzymatic dissociation by trypsin to obtain single cells. Cells were diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (Wisent Inc., cat n° 219–015-XK) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), and incubated at 37 °C with 5% CO2. Two additional cell lines were used in VNT for sensibility evaluation: OA3. Ts cells (CRL-6546, ATCC) and ESH-L cells obtained from Federal Research Institute for Animal Health, the Friedrich-Loeffler Institut (FLI) (Cat N°: CCLVRIE 0175). The two cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Wisent Inc., cat n° 219–015-XK), supplemented with 10% FBS. For each type of cells, a suspension (120,000 cells/cm^2) was prepared and added to the incubated plates at a volume of 150 µl. Few wells in the plate were dedicated to cells growth control (150 µl of cells) without virus or serum.
- All plates were incubated 6 days at 37 °C for CPE detection. Wells were considered negative when a typical CPE was observed. In the absence of CPE, the virus is considered neutralized and the well positive. The antibody titer was calculated using the method of Reed & Muench method (1938) (Reed and Muench, 1938) (American, 1938) and expressed log neutralizing doses 50% (DN 50%).

2.4. Serological analysis by immunoperoxidase assay (IPMA)

50 sera with strong positive titers and 50 sera with weak titers by ELISA and VNT were used to compare VNT, IPMA and IFA methods. The IPMA were performed as described by Haegeman (Haegeman et al., 2020). The test was conducted similarly to the VNT described above. Briefly, after three days incubation of plates containing virus/serum/cells, the plates were fixed with 4% paraformaldehyde and methanol/30% H_2O_2, washed with PBS, and the home made anti-SPPV serum was added (sheep). After 1 h incubation, the anti-Sheep IgG-peroxidase (Sigma Aldrich) was added, and the plates were incubated 1 h at 37 °C. After a final wash, 50 µl per well of a substrate solution (3-amino-9-diethyl-carbazole in 50 mM Na-acetate buffer with 0.05% hydrogen peroxide) was added to reveal the reaction. The mixture was incubated at room temperature for 15 min. The staining was stopped by eliminating the substrate and adding 100 µl of the Na-acetate buffer. Observation with inverted contrast microscope characterize positive wells as uncolored monolayer and negative wells as red stained wells. The antibody titer is calculated as above.

2.5. Serological analysis by immunofluorescence assay (IFA)

The test is similar to VNT and IPMA, reading plate wells was carried out by using inverted IF microscope after addition of anti-SPPV antibody and fluorescent rabbit antimouse dye-light 594 (Bethyl Laboratories, Inc.). The fluorescence signal was analyzed using an Olympus fluorescence microscope. The wells that display fluorescent foci were designated negative. And the cells that shows no fluorescence were considered positive.

2.6. Statistical analysis

Differences between antibody titers obtained by different type of serological tests were evaluated for significance by the method of Fisher. Values of $p \leq 0.01$ were considered significant.

To determine the specificity and the sensitivity of ELISA, we used VNT as the gold standard. We determined true positives (TPs) (ELISA positive and VNT positive), false positives (FPs) (ELISA positive and VNT negative), false negatives (FNs) (ELISA negative and VNT positive), and true negatives (TNs) (VNT ELISA and VNT negative). The formulae used were TP/(TP + FN) * 100 for the sensitivity and TN/(FP + TN) * 100 for the specificity.

3. Results

3.1. Sensitivity study of ELISA and VNT for SPPV antibody detection

Investigations were conducted on 220 sera for detection of SPPV antibody in sheep serum. Table 1 demonstrate that the highest number of positives tested sera was detected by VNT (70%) vs ELISA (48%). All negative sera by VNT were also negative by ELISA and 15 sera tested negative by ELISA were doubtful (13 sera) or weak positive (two sera) by VNT. Results also showed that half of the VNT weak positive sera were found doubtful by ELISA, and among 220 tested samples, 22,2% were doubtful by ELISA and only 6,8% by VNT.

The sensitivity of ELISA compared to that of VNT was 87.60%, while specificity was 100% (Table 1).

Obtained results demonstrate a high correlation (R^2) between ELISA and VNT in strong positive samples (0,383), and low correlation for weak (0, 00343), doubtful (0.0128) and negative (0,0023). Which indicate a higher sensibility of VNT to detect SPPV antibody comparatively to ELISA (Fig. 1).

3.2. Cells sensitivity of VNT using LT, OA3.Ts and ESH-L cells

A total number of 106 sera were selected for antibody titration by VNT using three types of cells; LT, OA3.Ts and ESH-L cells. Results showed that 99 samples were detected positive on the three tested cells. Seven samples were negative on LT and OA3.Ts cells, while only three were negative on ESH-L cells (all weak positive, average titer 0,9). The global titer of the 106 tested sera obtained was 1,73 on LT cells, 1,63 on OA3.Ts and 1,97 on ESH-L. There is a significant difference between the three used cells to detect CPE in VNT (⟨0,001).

Results obtained on OA3.Ts cells compared to those on LT cells showed a correlation factor (R^2) of 0,76 while correlation between ESH-L and LT cells was significantly higher (0,81) which indicate that both LT and ESH-L cells provide almost similar results (Fig. 2).

3.3. Investigation on VNT revelation method: CPE, IPMA and IFA

One hundred positive sera were tested by VNT on ESH-L cells and revelation was carried out by three techniques: direct CPE observation (OIE reference), specific immunoenzymatic (IPMA) and immunofluorescence methods (IFA). The average VNT titer was 1,9 by CPE detection, 2,5 by IPMA detection and 2,4 by IFA detection (Table 2). Statistical analysis showed a significant difference between the gold standard CPE and the specific IPMA and IFA methods (Table 3).

4. Discussion

A number of immunological methods can be used for antibodies titration; however, VNT is the recommended test in the OIE Terrestrial Manual for post vaccination monitoring which test reflect conferred protection in animals. However, VNT is a labor intensive, time consuming and requires biosafety level 3 containment to handle the infectious virus (Tuppurainen, 2017). ELISA test is more convenient for large scale monitoring, easy to perform and results can obtained in 24 h. In the presented study, we investigated 4 different serological methods for the detection of specific antibodies against SPPV. Samples were collected from vaccinated and unvaccinated sheep and tested by ELISA and three variant of VNT method comparatively, in the objective to propose the best technique for antibody detection and quantification.

Table 1
Sensitivity and specificity of ELISA in comparison with VNT.

ELISA results	VNT results	
	Number of positives	Number of negatives
Number of positives	106 (TP)	0 (FP)
Number of negatives	15 (FN)	50 (TN)
Sensitivity %	87.60%	
Specificity %	100%	

Currently vaccination against SPPV is the most effective way to control the spread of this virus and subsequently its economic damages (Madhavan et al., 2016) . Post vaccination monitoring is based on antibody detection in vaccinated animals, performed generally by VNT standard method using lamb testis cells. Recently, after LSD spread in Europe and Asia, an ELISA test has been developed and extensively used in the field for diagnosis or to evaluate conferred protection (Ochwo et al., 2019). Studies has proved a successful use of this test for the detection of antibodies against Lumpy Skin Disease (LSD) (Samojlovic et al., 2019). Although as indicated for the three capripoxviruses (SPPV, GTPV and LSD), this is the first time the ELISA commercial kit is evaluated for SPPV antibody detection regarding its sensitivity in comparison with the VNT gold standard.

Results showed that VNT is more sensitive than ELISA since 22% of positive tested sera were negative in ELISA. In addition, weak positive sera in VNT were either negative or doubtful in ELISA. This finding does not agree with that one reported by Nina et al. (2020) with test applied on LSD virus in cattle suggesting that despite cross-reaction between the three number of capripoxviruses there is a significant difference in ELISA results between SPPV and LSD viruses (Kresic, 2020).

In a previous study using an inactivated sheeppox virus as ELISA antigen, Babiuk and Wallace (2009) reported a sensitivity of 96% and specificity of 95% of the developed test, comparatively to VNT performed on OA3.Ts cells (Babiuk et al., 2009). This test is not available commercially; however, the high sensitivity and specificity could be explained by the use a specific SPPV antigen which probably not the case in our ELISA. Another similar ELISA test was developed by Bhanuprakash et al. (2006) based on a purified goat poxvirus antigen showed a sensitivity of 62% vs 48% in our study (Bhanuprakash et al., 2011).

The VNT as a gold standard technique in the OIE Manual is based on the use of primary lamb testis cells and the reading by CPE detection after neutralization with sera. Although, lamb testis are most sensitive cells for capripoxviruses replication it has been demonstrated recently that ESH-L of skin origin are more sensitive and can be maintained for several passages up to 40 (Rhazi et al., 2021). OA3.Ts have been also been used in VNT to avoid the hard work of preparation of primary cells but showed low sensitivity to SPPV compared to testis cells. In our study, sensitivity comparison between the three cells confirm that ESH-L are more convenient to perform VNT test since the global antibody titer obtained on those is higher than the titer on LT or OA3.Ts cells and CPE can be detect earlier an is more pronounced than in other cells. The final plate reading is up to 9 days in the OIE method on testis cells, while is 6 days on OA3.Ts cells, and only 4 days by the same technique on ESH-L, which is a great advantage.

To improve the VNT, we introduced a new method based on the use of anti-SPPV serum, which add specificity to the test. This technique has been used recently as a qualitative method to detect the presence or absence of antibody against SPPV by Haegman et al. (2019). In our study, sera where diluted to allow quantification of antibody, and this was the first time where the IPMA technique is applied as quantitative specific method for anti-SPPV antibody quantification. This method has been used for other viruses such as vaccinia virus, African swine fever virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus, swine hepatitis e virus (Afayoa et al., 2014; Gerber et al., 2012; Pileri et al., 2014; District, 2014) (Direksin et al., 2002) . Obtained results demonstrated the IPMA technique is more sensitive than the OIE standard method (antibody titer 2,5 vs 1,9). The method is specific detecting only the target virus and in addition, results can be obtained in 3 days versus 9 days in the VNT method.

IFA is also a specific method that has been used in our study to detect and quantify SPPV antibodies in sera of vaccinated sheep, which appeared to be a promising method for LSD virus (Abera et al., 2015). At our knowledge, VNT with revelation by IFA have never reported for

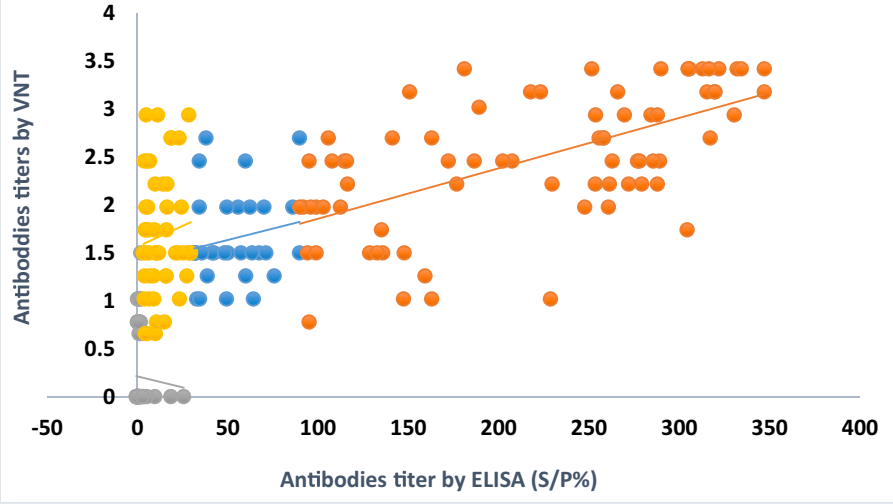


Fig. 1. Correlation between VNT and ELISA for detection of SPPV antibodies (strong positive (orange), weak positive (blue), doubtful (yellow) and negative (grey)). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

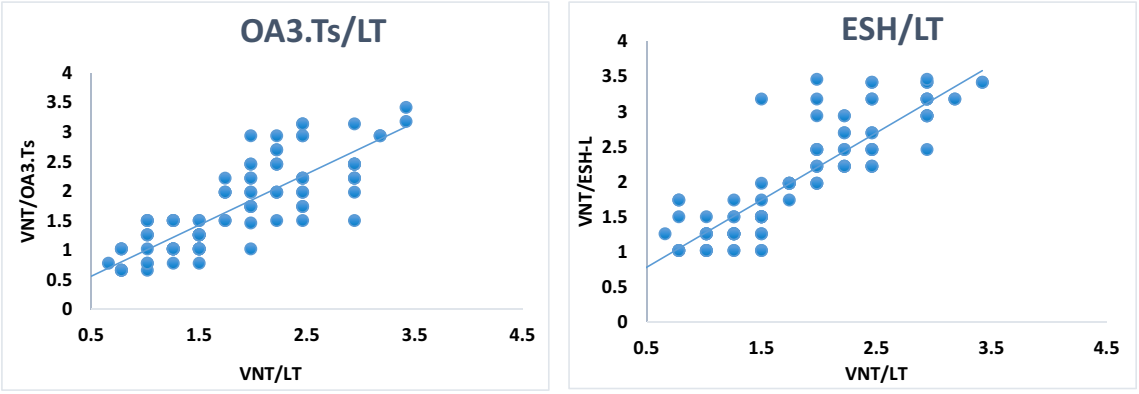


Fig. 2. Correlation between VNT results on OA3.Ts/LT and ESH-L/LT cells.

Table 2
Averages of antibody titer obtained by VNT, IPMA and IFA on 100 SPPV positive sera.

	VNT	IPMA	IFA
Weak positive	1.2408	1.9696	1.8296
Strong positive	2.5704	3.0216	2.96
Global	1.9	2.5	2.4

Table 3
Statistical significance calculated between tests.

	Test	*P* value
Weak positive	VNT/IFA	$p < 0.01$
	VNT/IPMA	$p < 0.01$
Strong positive	VNT/IFA	$p < 0.01$
	VNT/IPMA	$p < 0.01$

SPPV antibody detection and quantification. The sera tested positive by IFA were much higher than sera tested by VNT (2,4 vs 1,9), same results obtained by Milovanović et al. (2019) where it's found that the percentage of positive sera tested for LSD antibodies were obtained by IFA (Milovanovi et al., 2019).

In our study the IFA seem to be as sensitive as IPMA but required expensive reagents (conjugated antibody) and IF microscope, reading could influenced by operator. IFA has been used for detection of antibodies against cellular antigens for more than 50 years (Cytochemistry et al., 2019; Coons et al., 1941; Kaplan, 1951). This method was applied for large groups of antigens (Billiouw et al., 2005; Duarte et al., 2003; Groen et al., 1989).

5. Conclusion

The best method for detection and quantification of anti-SPPV antibody remain virus neutralization test, commercial ELISA showed poor sensitivity for SPPV compared to VNT. The use of primary cells for VNT is a heavy operation and time consuming and could be advantageously replaced by ESH-L cells of lamb skin origin. The immunoenzymatic revelation technique based on the anti-SPPV serum, added specificity to VNT with earlier results.

References

Abera, Z., Degefu, H., Gari, G., Kidane, M., 2015. Sero-prevalence of lumpy skin disease in selected districts of West Wollega zone. BMC Vet. Res. 1–9. https://doi.org/10.1186/s12917-015-0432-7.

Afayoa, M., et al., 2014. Comparison of Immunoperoxidase Monolayer Assay , Polymerase Chain Reaction and Haemadsorption Tests in the Detection of African Swine Fever Virus in Cell Cultures using Ugandan Isolates, vol. 6, pp. 36–45. https://doi.org/10.5897/JGMV2014.0062 no. 4.

American, T.H.E., 1938. The American, vol. 27, pp. 493–497 no. 3.

Babiuk, S., et al., 2009. Detection of Antibodies Against Capripoxviruses Using an Inactivated Sheeppox Virus ELISA, vol. 56, pp. 132–141. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2009.01067.x.

Beard, P.M., Kingdom, U., 2019. Capripoxviruses , Parapoxviruses , and Other Poxviruses of Ruminants. Elsevier Ltd.

Bhanuprakash, V., Indrani, B.K., Hosamani, M., Singh, R.K., 2006. The Current Status of Sheep Pox Disease, vol. 29, pp. 27–60. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2005.12.001.

Bhanuprakash, V., Hosamani, M., Juneja, S., Kumar, N., 2011. Detection of Goat pox Antibodies : Comparative Efficacy of Indirect ELISA and Counterimmunoelectrophoresis Detection of Goat pox Antibodies : Comparative Efficacy of Indirect ELISA and Counterimmunoelectrophoresis, vol. 2119. https://doi.org/10.1080/09712119.2006.9706613.

Billiouw, M., Brandt, J., Vercruysse, J., Speybroeck, N., 2005. Evaluation of the Indirect Fluorescent Antibody Test as a Diagnostic Tool for East Coast Fever in Eastern Zambia, vol. 127, pp. 189–198. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.028.

Causta, P.P.R.I., Kato, F., 1979. A New Freeze-Dried Living Virus Vaccine against Sheep-Pox, vol. 1, pp. 305–319.

Chand, P., Kitching, R.P., Black, D.N., 1994. Western Blot Analysis of Virus-Specific Antibody Responses for Capripox and Contagious Pustular Dermatitis Viral Infections in Sheep, pp. 377–385.

Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N., 1941. Experimental Biology and Medicine. https://doi.org/10.3181/00379727-47-13084P.

Cytochemistry, I., Cells, H., Dellavance, A., Eduardo, L., Andrade, C., 2019. Chapter 3, vol. 1901. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8949-2.

Direksin, K., Joo, H., Goyal, S.M., 2002. An Immunoperoxidase Monolayer Assay for the Detection of Antibodies Against Swine Influenza Virus, vol. 171, pp. 169–171.

District, T., 2014. Development of a Novel Immunoperoxidase Monolayer Assay for Detection of Swine Hepatitis E Virus Antibodies based on Stable Cell Lines Expressing the ORF3 Protein, vol. 62, pp. 243–256. https://doi.org/10.1556/AVet.2013.051 no. December 2013.

Duarte, P.C., Daft, B.M., Conrad, P.A., Packham, A.E., Gardner, I.A., 2003. Comparison of a Serum Indirect Fluorescent Antibody Test with Two Western Blot Tests for the Diagnosis of Equine Protozoal Myeloencephalitis, vol. 13, pp. 8–13.

Edition, S., 2008. World Organisation for Animal Health Manual of Diagnostic Tests and Vaccines (Mammals , Birds and Bees), , Sixth ed.vol. 2

Gari, G., Biteau-coroller, F., Legoff, C., 2008. Evaluation of Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) for the Diagnosis and Screening of Lumpy Skin Disease using Bayesian Method, vol. 129, pp. 269–280. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.005.

Gerber, P.F., Matos, A.C.D., Guedes, M.I.M.C., Madureira, M.C., Silva, M.X., Lobato, Z.I. P., 2012. Validation of an Immunoperoxidase Monolayer Assay for Total Anti – Vaccinia Virus Antibody Titration. https://doi.org/10.1177/1040638711435231.

Groen, J., Groen, G., Hoofd, G., Osterhaus, A., 1989. Comparison of Immunofluorescence and Enzyme- Linked Immunosorbent Assays for the Serology of Hantaan Virus Infections, vol. 23, pp. 195–203.

Haegeman, A., et al., Mar. 2020. An Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA) for the detection of lumpy skin disease antibodies. J. Virol. Methods 277, 113800. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113800.

Jenson, T.A., 2014. Chapter 13 Agar Gel Immunodiffusion Assay to Detect Antibodies to Type A Infl uenza Virus, vol. 1161, pp. 141–150. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8.

Kaplan, M.H., 1951. Localization of A N T I G E N I N Tissue Cells. no. 7.

Kresic, N., 2020. crossm Evaluation of Serological Tests for Detection of Antibodies against Lumpy Skin Disease Virus. no. May. https://doi.org/10.1128/JCM.00348-20.

Madhavan, A., Venkatesan, G., Kumar, A., 2016. Review article Capripoxviruses of small ruminants : current updates and future perspectives. Asian J. Anim. Vet. Adv. 11 (12), 757–770. https://doi.org/10.3923/ajava.2016.757.770.

Milovanovi, M., Dietze, K., Mili, V., Radoji, S., Val, M., Moritz, T., 2019. Humoral Immune Response to Repeated Lumpy Skin Disease Virus Vaccination and Performance of Serological Tests, pp. 1–9.

Ochwo, S., et al., 2019. Seroprevalence and Risk Factors for Lumpy Skin Disease Virus Seropositivity in Cattle in Uganda, pp. 1–9.

Office International des Epizooties, 2017. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. In: Chapter 2.4.13. Paris: Lumpy Skin Disease. OIE.

Pileri, E., Cortey, M., Rodríguez, F., Sibila, M., Fraile, L., Segalés, J., 2014. Comparison of the immunoperoxidase monolayer assay and three. Vet. J. 1, 3–6. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.025.

Rao, T.V.S., Bandyopadhyay, S.K., 2000. A Comprehensive Review of Goat Pox and Sheep Pox and their Diagnosis, vol. 1, pp. 127–136.

Rhazi, H., Safini, N., Mikou, K., Alhyane, M., Lenk, M., 2021. Comparative sensitivity study of primary cells , vero , OA3 . Ts and ESH-L cell lines to lumpy skin disease , sheeppox , and goatpox viruses detection and growth. J. Virol. Methods 293, 114164. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114164 no. April.

Samojlovic, M., Polacek, V., Lupulovic, D., Lazic, G., 2019. Detection of Antibodies against Lumpy Skin Disease Virus by Virus Neutralization Test and ELISA Methods. no. March. https://doi.org/10.2478/acve-2019-0003.

Shankar, H., Yadav, M.P., 1988. Detection of Goat Pox Antigen and Antibody by the Counter Immunoelectrophoresis Test, pp. 109–113.

Tuppurainen, E., 2017. Diagnostic Assays for the Detection of Lumpy Skin Disease Virus and Antibodies. no. October.

Tuppurainen, E.S.M., et al., 2017. Review : Capripoxvirus Diseases : Current Status and Opportunities for Control, vol. 64, pp. 729–745. https://doi.org/10.1111/tbed.12444.

Varshovi, H.R., Norian, R., Azadmehr, A., Ahangaran, N.A., 2021. Immune response Characteristics of Capri Pox Virus Vaccines Following Emergency Vaccination of Cattle Against Lumpy Skin Disease Virus. https://doi.org/10.22067/veterinary.v9i2.65381.

Discussion générale

Les résultats expérimentaux exposés dans ce travail ont déjà donné lieu à une analyse et une discussion ponctuelle au niveau de chaque article présenté. Il convient, ici, de les discuter globalement afin de circonscrire l'apport de l'étude dans l'amélioration du processus de la production des antigènes des Capripoxvirus et par conséquent dans la production des vaccins. C'est pourquoi il est d'abord nécessaire, avant d'entamer la discussion, de rappeler le contexte de notre travail sur les Capripoxvirus, nous tenterons ensuite de préciser quelques éléments qui justifient la démarche empruntée, nous rappellerons également, de façon succincte, les résultats importants trouvés en essayant de les confronter à ceux de la littérature et en mettant l'accent sur l'originalité et l'applicabilité du travail.

La clavelée ovine, la variole caprine et la dermatose nodulaire sont des maladies virales infectieuses, hautement contagieuses causées par les Capripoxvirus (CaPVs) : Sheeppoxvirus, (SPPV) pour les ovins, Goatpoxvirus GTPV pour les caprins et Lumpy skin disease virus (LSDV) pour les bovins. Ces maladies sont répandues principalement en Afrique et en Asie engendrant des pertes économiques importantes [284,285]. Au Maroc, la clavelée ovine cause annuellement des pertes directes par mortalité et morbidité et des pertes indirectes par le coût des vaccinations et l'entrave que la maladie cause à la commercialisation et à l'export des animaux ou de leurs produits [286]. La variole caprine et la dermatose nodulaire contagieuse bovine sont absentes au Maroc et en Afrique du Nord; cependant, la région reste sous la menace permanente d'une introduction à partir des pays limitrophes du Sahel où ces maladies sont endémiques. La prévention des infections aux Capripoxvirus n'est pas aisée car ces virus sont très contagieux et résistent bien dans le milieu extérieur, la transmission du virus LSDV par des vecteurs constitue également un moyen de dissémination non négligeable. La vaccination reste le moyen de lutte le plus efficace par des campagnes régulières à large couverture [287].

Le processus de fabrication des vaccins viraux est constitué de substrat cellulaire, du milieu de culture, de système de production, et des méthodes de diagnostic du vaccin. Par conséquent, le développement des vaccins doit s'intéresser à toutes ces étapes de production. Actuellement, les cellules utilisées pour l'isolement, la propagation et la production des vaccins CaPVs sont principalement des cellules primaires ; cependant, ces cellules présentent plusieurs inconvénients

comme la contamination virale et bactérienne après leur préparation qui est également une étape très lourde. C'est ainsi qu'une lignée cellulaire continue, isolée à partir de cellules épithéliales de rein extraites d'un singe vert africain, a été un objectif poursuivi par plusieurs auteurs pour la réplication des CaPVs. Ces cellules, appelées Vero, ont été utilisées pour la croissance et la multiplication du GTPV [288], pour la propagation du SPPV et pour la production de vaccins contre le LSDV [289,290]. Cependant, il s'est avéré que ces cellules ne sont pas efficaces en raison d'une faible réponse immunitaire chez les animaux [291,292]. Une autre lignée cellulaire isolée à partir de testicules d'agneau (OA3.Ts) a été évaluée pour la propagation des CaPVs, mais le titre était faible (4,8/ml pour le SPPV), la croissance était lente et son statut de pestivirus n'est pas clair [286]. Des études récentes ont évalué l'utilisation de cellules MDBK (Madin-Darby Canine Kidney) pour la réplication du LSDV, pour l'isolement du GTPV et pour la production de vaccins contre le SPPV [293, 294,295.296]. Le titre obtenu de SPPV est de 5,75/ml mais le statut de cette lignée cellulaire n'est pas confirmé indemne de BVD qui est une maladie virale très contagieuse affectant les bovins [297, 298,299].

L'environnement cellulaire joue un rôle primordial dans la multiplication cellulaire et virale, parce que plus l'environnement industrielle est similaire à l'environnement naturelle plus les cellules ont du potentiel de se différencier et de devenir les meilleures hôtes pour le virus qui pourra se répliquer. Afin de réaliser cette condition, le milieu de culture doit être adapté et modifié selon le type cellulaire utilisé en offrant des densités cellulaires élevées. De plus, le système de production influence aussi la multiplication cellulaire et virale. Actuellement les systèmes conventionnels sont les plus souvent utilisés pour la production des antigènes des vaccins CaPVs comme les systèmes stationnaires. Mais, si tous ces paramètres précédents sont améliorés, le vaccin viral ne se considère efficace qu'après la quantification des anticorps anti-CaPVs après vaccination. Les méthodes couramment utilisées sont ELISA et VNT, cependant ELISA ne présente pas une sensibilité élevée comme la VNT, et puisque cette dernière est basée sur la lecture du l'effet cytopathique des virus, elle perd un pourcentage de sa spécificité dans le cas du SPPV et du GTPV car ils ont un effet cytopathique un peu similaire sur les cellules.

Dans cette perspective, nous avons réalisé des recherches pour optimiser le processus de production des vaccins CaPVs en développant des cellules compétentes pour l'isolement, le contrôle et la production de ces virus et en adoptant aussi un nouvel système de production, une nouvelle

formule de milieu de culture et une nouvelle méthode spécifique et sensible pour l'étude de l'efficacité du vaccin CaPVs.

La première partie pratique de notre travail a été concentrée sur le substrat cellulaire ; c'est ainsi que dans un premier temps, on s'est intéressé aux cellules convenables pour l'isolement et le contrôle viral et ensuite aux cellules pour la production d'antigène du vaccin. Des cellules primaires d'agneau provenant de quatre tissus (cellules testiculaires, cellules rénales, cellules embryonnaires du cœur, cellules embryonnaires de peau) ont été préparées et testées avec 3 lignées cellulaires (Vero, OA3.Ts et ESH-L) pour l'isolement, la propagation et le cycle de vie des CaPVs. Nous avons confirmé par qPCR que les cellules ESH-L sont plus spécifiques que les cellules testiculaires primaires pour l'isolement du virus, car les cellules primaires peuvent probablement présenter des faux positifs en raison de virus récurrents ou de l'hétérogénéité cellulaire [300]. De plus, les cellules primaires peuvent développer des artefacts, ce qui rend la détermination des vrais échantillons positifs impossible à identifier sans immunomarquage supplémentaire ou confirmation par PCR. En 2018, des cellules ESH-L ont été utilisées par Asmelash Rassew et *al*. pour l'isolement du LSDV sur 6 biopsies cutanées et un effet viral caractéristique a été observé dans les cellules infectées dans les 5 jours d'incubation. Les échantillons étaient tous positifs sur les cellules ESH-L et par PCR [301], ce qui est en concordance avec nos résultats. Parmi les cellules primaires, les cellules d'origine embryonnaires du cœur étaient les plus permissives à la réplication du virus, suivies par les cellules LT. Parmi les trois lignées cellulaires testées, ESH-L a été capable de générer le titre le plus élevé de virus supérieur à celui généré par les lignées OA3.Ts et Vero dont le titre était similaire avec une différence au niveau de l'ECP qui est clair sur OA3.Ts et absent sur les cellules Vero et nécessite une coloration immunologique pour être détecté. Cela peut s'expliquer par le fait que les cellules Vero proviennent d'un rein de singe vert qui n'est normalement pas affecté par les CaPVs.

Les cellules embryonnaires du cœur ont un rendement cellulaire et viral important en comparaison avec les cellules ESH-L; cependant ces dernières sont des cellules diploïdes, qui peuvent achever des passages élevés et peuvent être conservées dans l'azote liquide jusqu'à utilisation. Pour ces raisons nous avons pensé à développer de cellules diploïdes à partir de cellules embryonnaires du cœur d'agneau, qui présentent les avantages des lignées cellulaires, et elles sont permissives aux différents genres de poxvirus.

La viabilité des cellules embryonnaires du cœur purifiées a été testée après cryoconservation dans de l'azote liquide, plus de 80% des cellules restent viables deux ans après la conservation, ce qui signifie qu'une préparation cellulaire peut suffire pour plus d'un an de production de virus. D'autres paramètres cellulaires ont été étudiés, le temps de doublement cellulaire était de 24 h et la monocouche n'est devenue confluente qu'après 72 h. Ainsi, les cellules pourraient être manipulées deux fois par semaine, ce qui est bénéfique pour une production rapide. La génération d'une courbe de croissance peut être utile pour évaluer les caractéristiques de croissance d'une cellule; la phase de latence, qui est la phase initiale de croissance de la sous-culture et du réensemencement pendant laquelle la population cellulaire met du temps, d'environ 24 h, pour se rétablir. Au cours de cette phase, la cellule remplace les éléments du glycocalyx perdus lors de la trypsination, se fixe au substrat et s'étale. Le cytosquelette réapparaît lors du processus d'étalement, qui fait partie intégrante du processus [302]. La phase logarithmique se produit entre 24 et 72 h, qui est une période d'augmentation exponentielle du nombre de cellules et de la croissance de la population cellulaire due à la division continue. La longueur de la phase logarithmique dépend de la densité d'ensemencement initiale, du taux de croissance cellulaire et de la densité à laquelle la prolifération cellulaire est inhibée. Cette phase représente la forme de culture la plus reproductible car la viabilité de la fraction de croissance est élevée et la population est uniforme [303]. La phase stationnaire se produit entre 72 et 96 h, et la culture devient confluente à la fin de la phase logarithmique, car le taux de croissance diminue pendant cette phase et la prolifération cellulaire cesse en raison de l'épuisement. Les cellules sont en contact avec les cellules environnantes et la surface de croissance est occupée. A ce stade, la culture entre en phase stationnaire et la fraction de croissance tombe entre 0 et 10 % [304]. Wang et *al*. [305] ont également constaté que les cellules de Sertoli bovines se développaient en une monocouche confluente en 72 h, 16 h à P3 parmi 20 passages. Dans notre étude, 45 passages ont été testés pour les rendements cellulaires afin de définir le passage optimal des cellules stockées avec un coefficient de corrélation (R^2) > 0,9, indiquant une très forte corrélation positive. Les résultats ont confirmé que la division cellulaire a diminué à P38, P39 et P40 après avoir atteint la limite de Hayflick. En effet, Hayflick suggère qu'une cellule ne peut terminer la mitose ou la duplication et la division cellulaires que 40 à 60 fois avant de subir l'apoptose [306]. Cette conclusion est valable pour de nombreux types de cellules, adultes et fœtales. Il semble y avoir une corrélation entre le nombre maximum de passages et le vieillissement. Ce phénomène est lié à la longueur des télomères. Des

mitoses répétées entraînent un raccourcissement des télomères sur l'ADN de la cellule ce qui peut expliquer l'arrêt de la prolifération cellulaire [307].

Dans la deuxième partie pratique nous étions capables de montrer que le rendement cellulaire des cellules embryonnaires du cœur peut être augmenté en ajoutant des phytohormones dans la culture. Les hormones végétales sont des substances biologiquement actives de faible poids moléculaire et de composition chimique diversifiée. Ils sont produits par les cellules végétales et régulent de nombreux processus physiologiques, tels que les réponses au stress, la stimulation ou l'inhibition du développement et de la croissance des plantes [308]. L'impact des phytohormones sur les cellules de mammifères a suscité un intérêt considérable dans plusieurs études, cependant leur effet n'a pas encore été étudié de manière approfondie.

Dans cette étude nous avons étudié l'impact de l'auxine, la gibbérelline, et la kinétine sur les cellules embryonnaires du cœur. Nous avons d'abord déterminé la concentration optimale de chaque phytohormone. Cela a été fait en deux étapes ; un test MTT a été effectué afin de déterminer l'intervalle de concentrations adéquates, puis un test de rendement cellulaire a été effectué pour déterminer la concentration qui a produit la croissance cellulaire la plus élevée. Les résultats du MTT ont montré qu'il existe une différence significative entre les concentrations choisies et le contrôle. De plus, la comparaison du rendement cellulaire a montré que la concentration idéale d'auxine est de 1/4, elle est de 1/128 pour la gibbérelline et de 1/32 pour la kinétine. Nos résultats ont également montré que c'est la kinétine qui est le stimulateur le plus puissant. Won et *al*. [309] ont démontré que dans les cellules somatiques NT, la kinétine a augmenté la proportion d'embryons développés en blastocystes de 7,5% à 15,4%. L'étude cinétique a démontré que le pic de croissance cellulaire des cellules cardiaques est atteint au 4ème jour après l'incubation. Ceci est suivi par la gibbérelline puis l'auxine. Selon les résultats obtenus par Singh et *al*. [310], la kinétine améliore davantage la densité cellulaire que l'auxine pour les lignées cellulaires de mammifères HEK293 et NIH3T3. Cependant, Cernaro et a*l*. [311] ont prouvé que la prolifération de LLC-PK1 augmentait de manière significative, par rapport aux cellules témoins, 72 h après l'ajout d'auxine aux cellules cultivées [312]. La kinétine et la gibbérelline favorisent la division et la prolifération cellulaire. Il a été démontré que la kinétine est impliquée dans la régulation de nombreux aspects de la croissance et de la différenciation [313,314]. Historiquement, la kinétine a été décrite à l'origine comme un facteur de division cellulaire en favorisant la synthèse d'enzymes de réparation de l'ADN, l'activité de la superoxyde dismutase et

la transcription de l'ARN ribosomal [315, 316,317]. Patrick et *al*. [318] ont annoncé que la signalisation de la gibbérelline contrôle le taux de prolifération cellulaire chez *Arabidopsis*, et favorise la croissance en stimulant la destruction des protéines DELLA réprimant la croissance nucléaire [319]. Olszewski et *al*. [320] démontrent que la gibbérelline est un régulateur de la croissance, elle régule également un large éventail de processus de développement.

L'augmentation de la croissance cellulaire en présence des phytohormones a été prouvée indirectement par la consommation de glucose et la réduction du pH de la culture cellulaire. Notre test démontre que le pH et la concentration de glucose des cellules embryonnaires du cœur étaient les plus bas lorsque la culture est complétée par de la kinétine suivie de la gibbérelline et d'auxine. Pour les cellules Vero, les valeurs ont chuté pour la culture additionnée de gibbérelline suivie de la kinétine et d'auxine. Un pH bas peut être une limitation de la culture cellulaire, cependant, il peut être résolu par l'ajout d'un tampon pH au début de l'incubation. Par ailleurs, l'ensemble de ces résultats quant à l'effet des phytohormones sur la croissance cellulaire, montre clairement que cet effet dépend de la nature des cellules et du type d'hormone.

Nos résultats ont également montré que les phytohormones ont un effet positif sur la morphologie cellulaire. Cet effet s'observe surtout après l'ajout de l'auxine qui a dilaté les cellules qui ont pris une forme particulière avec plus de longitude. L'auxine est une hormone végétale bien connue pour stimuler l'élongation cellulaire en augmentant l'extensibilité des parois. Elle participe à la régulation des propriétés des parois cellulaires en induisant un relâchement des parois qui est confirmée par différentes études [321, 322,323].

Un effet des phytohormones sur le stress cellulaire est également mis en évidence; en effet le contrôle, composé de cellules cultivées sans adjonction de phytohormones, a montré un stress cellulaire qui n'a pas été observé dans le cas des cultures cellulaires avec phytohormones. La recherche a montré que les phytohormones réduisent le stress cellulaire en raison de leurs propriétés antioxydantes [324, 325, 326,327]. Eman et *al*. [328] ont démontré que la kinétine confère une protection aux cellules contre le stress oxydatif en réduisant significativement la production d'espèces réactives de l'oxygène par l'intermédiaire de la 4-nitroquinoléine 1-oxyde. L'observation que les phytohormones peuvent être impliquées dans le processus de la régénération des cellules de mammifères est un défi et ouvre de nouveaux scénarios dans le domaine de la production de vaccins. En effet, les résultats préliminaires que nous rapportons sur les effets prolifératifs des hormones

végétales sur les cellules de mammifères pourraient stimuler une nouvelle ligne de recherche visant à étudier l'impact de ces hormones sur d'autres lignées cellulaires et leur influence sur plusieurs passages cellulaires. De plus, des études supplémentaires devraient être menées pour déterminer si elles affectent la propagation et la multiplication des virus au cours du processus de production d'antigènes et leur faisabilité industrielle.

Concernant l'étudie et l'amélioration du système de production des antigènes des vaccins CaPVs, le système conventionnel stationnaire (Cell Factories) est comparé à un nouveau système à lit fixe qui est le système CelCradle™ -500A. Pour ceci le LSDV est cultivé sur des cellules primaires testiculaires d'agneau et les virus PPR et RVF sont cultivés sur les cellules Vero. La comparaison a porté sur la croissance cellulaire des deux types de cellules et sur les titres viraux des 3 virus dans les deux systèmes.

En vue de réduire le pourcentage du sérum dans le milieu de croissance, les cellules Vero ont été cultivées dans du DMEM avec différents pourcentages de FBS, (1, 3 et 5%). Les résultats ont montré que dans le système CelCradle l'attachement cellulaire le plus important a été obtenu avec 1 % de FBS avec un total de $2,3 \times 10^8$ cellules/bouteille après 3 h d'incubation et 30×10^8 cellules/bouteille en 5 jours d'incubation. Cette croissance est meilleure par rapport à celle trouvée par Hiroko et *al*. [279] dans une étude similaire menée au Japon avec des cellules Vero où le nombre total de cellules trouvé est de 28×10^8 cellules/bouteille après 7 jours d'incubation. En outre, les cellules Vero, ont une multiplication dans le CelCradle 19 fois par rapport au Cell Factories. Ceci est avantageux de point de vue stratégies de mise à l'échelle et pour l'obtention des titres viraux plus élevés.

Le temps de doublement typique des cellules Vero est de 24 h par Cell Factories. Sur CelCradle™ -500A, nous avons obtenu un temps de doublement (DT) de 28 h. Ceci est cohérent avec les résultats trouvés par d'autres auteurs dans les mêmes conditions où le temps de doublement cellulaire était relativement plus long de 28 à 38 h [329]. Un temps plus lent de 44,4 h est signalé par Laï et *al*. [330]. En utilisant le système CelCradle ceci prouve l'efficacité de nos conditions de croissance cellulaire.

Les cellules testiculaires ont été cultivées dans le CelCradle™-500A jusqu'à un nombre total de $6,7 \times 10^8$ cellules/bouteille après 8 jours de culture ; avec le Cell Factories, nous avons obtenu $6,23 \times 10^8$ cellules/bouteille après 6 jours de culture. Toutefois, après 6 jours de culture, le nombre

de cellules a chuté de façon drastique et a montré une forte diminution de la viabilité due à la difficulté de régulation du pH, la faible aération et la limitation des métabolites. A ce jour, très peu d'études ont rapporté une culture efficace de cellules primaires en utilisant le système CelCradle™ -500A. Chen et al. [331] ont utilisé le même système CelCradle pour différencier les cellules souches dérivées des canaux pancréatiques de rat (PDSC) et ils ont obtenu avec succès une multiplication 10 fois plus pendant une période de culture de 7 jours.

Concernant la cinétique de trois virus, les titres obtenus étaient similaires dans les deux systèmes de production pour les virus de la PPR et RVF. Alors que pour le virus LSDV, le titre était plus élevé dans CelCradle™ - 500A par rapport au Cell Factories de $4{,}78 \times 10^6$ unités infectieuses. Le temps d'infection était de 3 jours plus long dans CelCradle™ -500A que dans Cell Factories, il a également été signalé des temps d'infection plus longs de 6 jours (Ho et *al*. en 2004), et 12 jours [332].

Les systèmes de culture conventionnels pour les cellules adhérentes ont tendance à réduire la croissance cellulaire en raison de leur limitation d'espace et d'oxygénation. Le système CelCradle™-500A offre de nombreux avantages à différents niveaux. L'environnement 3D augmente la surface de culture, une distribution uniforme des cellules et une aération et une nutrition maximales. Ceci fournit un faible cisaillement, une aération élevée sans limitation d'O_2 et un environnement de culture sans mousse. Ainsi, une densité cellulaire optimale et par conséquent, des titres viraux élevés. De plus, leurs matrices de croissance cellulaire permettent l'adhérence des cellules Vero en milieu pauvre en sérum, ce qui réduit le coût de la production.

Grâce à sa conception simple, ce système est extrêmement facile à manipuler et à utiliser et peut être utilisé pour la production de vaccins à petite échelle. Ces avantages lui permettent de devenir un outil simple et système économique pour la culture cellulaire à haute densité et production virale. Il a été utilisé avec succès pour cultiver des cellules primaires mais il a été plus favorable pour la lignée cellulaire Vero et pour la production des vaccins contre la PPR, la RVF et le LSD. Cependant les titres viraux étaient comparables dans les deux systèmes. Puisque tous nos essais ont été réalisés sans réapprovisionnement de milieu, ces titres pourraient être optimisés par l'utilisation d'un système de perfusion. Pour LSDV l'utilisation de la lignée embryonnaire du cœur dans ce système va augmenter de plus la densité cellulaire comme la lignée cellulaire Vero, en offrant un rendement viral très important.

L’étape finale de la partie pratique de ce travail était l’introduction d’une nouvelle méthode de diagnostic du vaccin CaPVs, en testant un vaccin type contre SPPV. Généralement un certain nombre de méthodes immunologiques peuvent être utilisées pour la détection des anticorps, mais la VNT est le test recommandé dans l'OMSA pour le suivi de la post-vaccination. Cependant, la VNT est une tâche lourde demandant beaucoup de temps, une main-d'œuvre et nécessite un confinement de niveau 3 de biosécurité pour manipuler les virus infectieux [333]. Le test ELISA est plus pratique pour la surveillance à grande échelle, facile à réaliser et les résultats peuvent être obtenus en 24 h. Dans notre étude, dans le but de proposer la meilleure technique de détection et de quantification des anticorps nous avons étudié 4 méthodes sérologiques différentes pour la détection d'anticorps spécifiques contre le SPPV. La première méthode est l’ELISA et les trois autres méthodes sont la méthode VNT basée sur l’observation de l’ECP, la méthode VNT révélée par IPMA et la VNT révélée par IFA. De plus, nous avons comparé les cellules testiculaires qui sont utilisés dans la méthode standard avec autres cellules ; OA3.Ts et ESH-L.

Les résultats ont montré que la VNT est plus sensible que l'ELISA puisque 22 % des sérums testés positifs étaient négatifs par ELISA. En outre, les sérums faiblement positifs en VNT étaient soit négatifs soit douteux par l’ELISA. Dans une étude précédente utilisant un virus de la clavelée inactivé comme antigène d’ELISA, Babiuk et Wallace [334] ont rapporté une sensibilité de 96% et spécificité de 95% du test développé, comparativement au VNT réalisé sur des cellules OA3.Ts. La sensibilité et la spécificité élevées pourraient être expliquées par l'utilisation d'un antigène SPPV spécifique ce qui n'est probablement pas le cas dans notre ELISA. Un autre test ELISA similaire a été développé par Bhanupra kash et *al*. [335] sur la base d'un antigène purifié de poxvirus de chèvre; ce test a montré une sensibilité de 62% contre 48% dans notre étude. La VNT, en tant que technique de référence dans le Manuel de l'OMSA, est basée sur l'utilisation de cellules primaires de testicule d'agneau et la lecture par détection de l’ECP après neutralisation. Bien que les testicules d'agneau fussent considérés comme les plus sensibles cellules pour la réplication des Capripoxvirus, nous avons démontré auparavant que les ESH-L sont plus sensibles et peuvent être maintenues pendant plusieurs passages (jusqu’à 40 passages). Les OA3.Ts ont également été utilisées dans VNT pour éviter la préparation lourde des cellules primaires mais elles ont montré une faible sensibilité au SPPV par rapport aux cellules testiculaires. Dans notre étude, la comparaison de la sensibilité entre les trois cellules confirme que les ESH-L sont plus pratiques pour effectuer le test VNT puisque le titre global

d'anticorps obtenu sur ces cellules est supérieur au titre sur les cellules LT ou OA3.Ts et l'ECP peut être détecté plus tôt que dans les autres cellules. La lecture finale de la plaque est de 9 jours dans le cas de la méthode de l'OMSA sur les cellules testiculaires, alors qu'elle est de 6 jours sur les cellules OA3.Ts, et seulement 4 jours par la même technique sur les cellules ESH-L, ce qui est un grand avantage.

Pour améliorer la VNT, nous avons introduit une nouvelle méthode basée sur l'utilisation de sérum anti-SPPV (IPMA), qui ajoute la spécificité au test. Cette technique a été utilisée récemment comme méthode qualitative pour détecter la présence ou l'absence d'anticorps contre SPPV par Haegman et *al*. [336]. Dans notre étude, les sérums ont été dilués pour permettre la quantification des anticorps, et c'était pour la première fois que la technique IPMA était appliquée comme méthode quantitative spécifique pour les anticorps anti-SPPV. Cette méthode a été utilisée pour d'autres virus tels que le virus vaccinia, le virus de la peste porcine africaine, circovirus porcin de type 2, le virus de la grippe porcine, le virus de l'hépatite porcine [277, 337,338]. Les résultats obtenus ont démontré que l'IPMA est plus sensible que la méthode standard de l'OMSA (titre anticorps 2,5 contre 1,9).

L'IFA est également une méthode spécifique qui a été utilisée dans notre étude pour détecter et quantifier les anticorps anti-SPPV dans les sérums de moutons vaccinés, ce qui semblait être une méthode prometteuse. L'IFA est utilisé pour la détection d'anticorps dirigés contre des antigènes cellulaires depuis plus de 50 ans [339, 340]. Cette méthode a été appliquée pour de grands groupes d'antigènes [341,342]. À notre connaissance, les VNT avec révélation IFA n'ont jamais été rapportés pour la détection et la quantification des anticorps SPPV. Les sérums ont été testés positifs par IFA étaient beaucoup plus élevés que les sérums testés par VNT (2,4 contre 1,9). Des résultats similaires ont été obtenus par Milovanovic et *al*. [343] où il a été constaté que le pourcentage le plus élevé de sérums positifs testés pour les anticorps LSD a été obtenu par IFA. Dans notre étude, l'IFA semble aussi être plus sensible que l'IPMA mais nécessite des réactifs coûteux (anticorps conjugué) et un microscope IF ; de plus, la lecture pourrait être influencée par l'opérateur.

En conclusion la méthode la plus sensible pour la détection des anticorps anti-CaPVs reste le test de neutralisation du virus. En outre l'utilisation de cellules primaires pour VNT est une opération lourde et pourrait être remplacée par la lignée cellulaire ESH-L. La technique de révélation IPMA a ajouté une spécificité au VNT grâce à l'utilisation des anticorps spécifique de détection.

Conclusion et Perspectives

La prévention et le contrôle des virus LSDV, SPPV et GTPV sont principalement basés sur la vaccination, menée dans les régions endémiques, par des vaccins vivants atténués préparés sur des cellules primaires utilisant un milieu riche en sérum animal et utilisant le système conventionnel. Dans ce travail, nous avons évalué différents types cellulaires (primaires et lignées) (cellules primaires de testicules d'agneau, cellules primaires embryonnaires du rein, de peau, du cœur d'agneau, OA3.Ts, Vero, ESH-L) pour l'isolement des virus CaPVs, et nous avons préparé et étudié l'utilisation d'une nouvelle lignée cellulaire dérivée de l'embryon du cœur d'agneau pour la production des antigènes des CaPVs. De plus, nous avons évalué l'utilisation d'un nouvel système de production pour ces virus, nouvelle composition du milieu de culture et aussi nous avons proposé une nouvelle méthode de diagnostic.

Les résultats montrent que :

- Les cellules ESH-L et les cellules primaires embryonnaires du cœur d'agneau sont des cellules les plus sensibles pour la détection et propagation des virus CaPVs ;
- Les cellules purifiées embryonnaires du cœur d'agneau sont des cellules efficaces pour la réplication et la production de Poxvirus ;
- Le système Celcradle-500A est un système prometteur pour la production industrielle des vaccins CaPVs au lieu du system conventionnel ;
- L'Ajout des phytohormones au milieu de culture cellulaire cause une amélioration de la croissance et de la densité cellulaires et élimine le stress cellulaire ;
- La méthode IPMA, basée sur l'utilisation des sérums spécifiques aux CaPVs pour la lecture de la VNT sur les cellules ESH-L, est la méthode la plus spécifique et sensible pour la quantification des anticorps post-vaccination contre les CaPVs.

En perspectives, ce travail peut être complété et enrichi par les points suivants :

- La production des vaccins CaPVs sur les cellules embryonnaires du cœur d'agneau en utilisant le system Celcradle-500A ;
- L'utilisation des phytohormones au cours de cette production ;

- Le contrôle et le titrage de ces vaccins utilisant les cellules ESH-L ;
- La vaccination des animaux et étude de l'efficacité de ces vaccins et comparaison avec les vaccins produits sur les cellules primaires et les lignées cellulaires.

Références bibliographiques

1. Haegeman, A., et al., 2019a. Overview of diagnostic tools for Capripox virus infections. Prev. Vet. Med. 104–704. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104704.

2. Hurisa, T. T., Jing, Z., Jia, H., Chen, G. & He, X. B., 2018. A Review on Sheeppox and Goatpox: Insight of Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Control Measures in Ethiopia. J Infect Dis Epidemiol 4, 057, https://doi.org/10.23937/2474-3658/1510057.

3. Gari, 2011. Etude épidémiologique de la dermatose nodulaire contagieuse bovine en Ethiopie et évaluation de son impact économique (thèse).

4. Diallo, A., Viljoen, G.J., 2007. Genus Capripoxvirus. In: Mercer, A.A., Schmidt, A., Weber, O. (Eds.), Poxviruses. Birkhäuser, Basel, pp. 167–181

5. Lafar, S., Zro, K., Haegeman, A., Khayli, M., De Clercq, K., Lancelot, R., Ennaji, M.M., 2019. Clinical and Epidemiological Evolution of Sheep Pox in Morocco. Journal of Agricultural Science and Technology, 103-113 doi: 10.17265/2161-6256/2019.02.004

6. Tuppurainen, E.S.M., Venter, E.H., Shisler J.L., Gari G., Mekonnen, G.A., Juleff, N., Lyons, N.A., De Clercq, K., Upton, C., Bowden, T.R., Babiuk, S., Babiuk, L.A., 2017b. Review: Capripoxvirus Diseases: Current Status and Opportunities for Control. Transboundary and Emerging Diseases 64, 729-745.

7. Babiuk, S., Parkyn, G., Copps, J., Larence, J.E., Sabara, M.I., Bowden, T.R., David, 2007. Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. J. Veterinary Diagnostic. 19, 486–491. https://doi.org/10.1177/ 104063870701900505.

8. Babiuk, S., Bowden, T.R., Boyle, D.B., Wallace, D.B., Kitching, R.P., 2008. Capripoxviruses : an emerging worldwide threat to sheep. Goats and Cattle. 55, 263–272

9. Mahmoud, A., Khalafalla, A., Abdellatif, M., 2016. An epidemiological study of sheep and goat pox outbreaks in the Sudan. 2016. Food Biol. 5, 1–5. https://doi.org/ 10.19071/fbiol.2016.v5.3007.

10. LSD – National Veterinary Institute (nvi.com.et), consulted on 12/01/2021.

11. Getachew, G., Getnet, A., Gizawa, D., Wubetea, A., Kidanea, M., Asgedoma, H., Bayissa, B., Ayelet, G., Oura, Ch.A.L., Roger, F., Tuppurainen, E.S.M., 2015

12. Gari, G., Biteau-coroller, F., Legoff, C., 2008. Evaluation of Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) for the Diagnosis and Screening of Lumpy Skin Disease using Bayesian Method, vol. 129, pp. 269–280. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.005.

13. Chand, P., Kitching, R.P., Black, D.N., 1994. Western Blot Analysis of Virus-Specific Antibody Responses for Capripox and Contagious Pustular Dermatitis Viral Infections in Sheep, pp. 377–385.

14. Office International des Epizooties, 2017. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. In: Chapter 2.4.13. Paris: Lumpy Skin Disease. OIE.

15. ICTV, 2008. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/.

16. Capripoxviruses: Transboundary Animal Diseases of Domestic Ruminants. Moustafa Kardjadj. 2016. Annals of Virology and Research. 2(3): 1024.

17. Maksyutov, R.A., E.V. Gavrilova, A.P. Agafonov, O.S. Taranov, A.G. Glotov, V.N. Miheev, S.N. Shchelkunov, and A.N. Sergeev. 2015. An outbreak of sheep pox in Zabajkalskij kray of Russia. Transboundary and Emerging Diseases 62 (4): 453–456. https://doi.org/10.1111/tbed.12176.

18. Bhanuprakash, V., G. Venkatesan, V. Balamurugan, M. Hosamani, R. Yogisharadhya, R.S. Chauhan, A. Pande, B. Mondal, and R.K. Singh. 2010. Pox outbreaks in sheep and goats at Makhdoom (Uttar Pradesh), India: evidence of sheeppox virus infection in goats. Transboundary and Emerging Diseases 57 (5): 375–382. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01158.x.

19. Sheep Pox and Goat Pox Capripoxvirus Infections, Capripox. 2017. CFSPH.

20. He, C., J. Tong, X. Zhang, M. Tuohetiniyazi, Y. Zhang, and Y. Li. 2020. Comparative analysis of ankyrin (ANK) genes of five capripoxviruses isolate strains from Xinjiang province in China. Virology Journal 17 (1): 1–18 10.1186/s12985-020-01407-w.

21. Capripoxviruses. 2008. R.P. Kitching. Encyclopedia of Virology (Third Edition). Pages 427-432. https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00477-5.

22. Babiuk, Shawn, T.R. Bowden, G. Parkyn, B. Dalman, D.M. Hoa, N.T. Long, P.P. Vu, D.X. Bieu, J. Copps, and D.B. Boyle. 2009b. Yemen and Vietnam capripoxviruses demonstrate a distinct host preference for goats compared with sheep. Journal of General Virology 90 (1): 105–114. https://doi.org/10.1099/vir.0.004507-0.

23. Davies, F.G. 1982. Observations on the epidemiology of lumpy skin disease in Kenya. Journal of Hygiene 88 (1): 95–102. https://doi.org/10.1017/S002217240006993X.

24. USDA. (2016). Sheep and goat pox standard operating procedures: Overview of etiology and ecology.

25. Fagbo, S., J. A. W. Coetzer, and E. H. Venter, 2014: Seroprevalence of Rift Valley fever and lumpy skin disease in African buffalo (Syncerus caffer) in the Kruger National Park and Hluhluwe iMfolozi Park, South Africa. J. S. Afr. Vet. Assoc. 85, 1075

26. Barnard, B. J. H., 1997: Antibodies against some viruses of domestic animals in South African wild animals. Onder stepoort J. Vet. Res. 64, 95–110.

27. Kumar R, Godara B, Chander Y, Kachhawa JP, Dedar RK, Verma A, Riyesh T, Pal Y, Barua S, Tripathi BN, Kumar N. Evidence of lumpy skin disease virus infection in camels. Acta Trop. 2023 Jun;242:106922. doi: 10.1016/j.actatropica.2023.106922. Epub 2023 Apr 7. PMID: 37031926.

28. Chapter 28 - Capripoxvirus Diseases: Current Updates and Developed Strategies for Control. 2020. Sara Lafar, Khalil Zro, Moulay Mustapha Ennaji. Emerging and Reemerging Viral Pathogens. Volume 1: Fundamental and Basic Virology Aspects of Human, Animal and Plant Pathogens. Pages: 635-655 https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819400-3.00028-4.

29. Delaune, D., Iseni, F., Ferrier-Rembert, A., Peyrefitte, C.N., Ferraris, O., 2017. The French armed forces virology unit: a chronological record of ongoing research on Orthopoxvirus. MDPI J. 10, 3.

30. Viral Pathogens of Domestic Animals and Their Impact on Biology, Medicine and Agriculture P Murcia, W Donachie, Moredun, Palmarini. 2009. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). Pages 805-819.

31. CHAPTER 19 - Origin and Evolution of Poxviruses. John W. Barrett, Grant McFadden. 2008. Origin and Evolution of Viruses (Second Edition). Pages 431-446.

32. Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sur JH, Sandybaev NT, Kerembekova UZ, Zaitsev VL, Kutish GF, Rock DL. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. J Virol. 2002 Jun;76(12):6054-61. doi: 10.1128/jvi.76.12.6054-6061.2002. PMID: 12021338; PMCID: PMC136203.

33. Family – Poxviridae. 2012. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Pages 291-309.

34. Moss, B., 2001. Poxviridae: the viruses and their replication, In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), 4 ed. Fields Virology, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2849–2883. 2 vols.

35. Smith, G. L., Murphy, B. J. and Law, M., 2003. Vaccinia virus motility. Annu Rev Microbiol. 57-323-42.

36. McIntosh, A. A. and Smith, G. L., 1996. Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus. J Virol. 70,272-81.

37. https://viralzone.expasy.org/152.

38. Transmission of lumpy skin disease virus: A short review. 2019. A. Sprygin, Ya Pestova, D.B. Wallace, E. Tuppurainen, A.V. Kononov. Virus Research. Volume 269, August 2019, 197637.

39. Mersha, C., 2011. Clinical and histopathological study of sheep pox in Ethiopia. International journal of Natural Science, 1, 8-92.

40. Chala, A.A., 2017. MSc thesis, Isolation and characterization of poxvirus circulating in sheep and goat from outbreak cases of Adea Berga district, West Shoa zone, Central fEthiopia.

41. Chapter 1 – Biosecurity. George M. Barrington. 2014. Llama and Alpaca Care. Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd Health. Pages 1-5.

42. Weiss, K. E., 1968: Lumpy skin disease virus. Virol. Monogr. 3, 111–131.

43. Carn, V. M., and R. P. Kitching, 1995b: An investigation of possible routes of transmission of lumpy skin disease virus (Neethling). Epidemiol. Infect. 114, 219–226.

44. Tuppurainen, E. S. M., J. C. Lubinga, W. H. Stoltsz, M. Troskie, S. T. Carpenter, J. A. W. Coetzer, E. H. Venter, and C. A. L. Oura, 2013a: Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by Rhipicephalus appendiculatus male ticks. Epidemiol. Infect. 141, 425–430.

45. Kitching, R. P., and P. S. Mellor, 1986: Insect transmission of capripoxvirus. Res. Vet. Sci. 40, 255–258.

46. sheep and goat pox. Tuppurainen, E. 2022. CABI Compendium. CABI International. doi: 10.1079/cabicompendium.81537.

47. Al-Salihi, K. A., and I. Q. Hassan, 2015: Lumpy skin disease in iraq: study of the disease emergence. Transbound. Emerg. Dis. 62, 457–462.

48. Annandale, C. H., D. E. Holm, K. Ebersohn, and E. H. Venter, 2013: Seminal transmission of lumpy skin disease virus in heifers. Transbound. Emerg. Dis. 61, 443–448.

49. Aedes aegypti (Diptera : Culicidae). Epidemiol. Infect. 126, 317–321.

50. Chihota, C. M., L. F. Rennie, R. P. Kitching, and P. S. Mellor, 2003: Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. Med. Vet. Entomol. 17, 294–300.

51. Şevik M, Doğan M. Epidemiological and Molecular Studies on Lumpy Skin Disease Outbreaks in Turkey during 2014-2015. Transbound Emerg Dis. 2017 Aug;64(4):1268-1279. doi: 10.1111/tbed.12501. Epub 2016 Apr 3. PMID: 27039847.

52. https://www.pirbright.ac.uk/lumpyskin, consulte le 23/08/23.

53. Sohier C, Haegeman A, Mostin L, De Leeuw I, Campe WV, De Vleeschauwer A, Tuppurainen ESM, van den Berg T, De Regge N, De Clercq K. Experimental evidence of mechanical lumpy skin disease virus transmission by Stomoxys calcitrans biting flies and Haematopota spp. horseflies. Sci Rep. 2019 Dec 27;9(1):20076. doi: 10.1038/s41598-019-56605-6. PMID: 31882819; PMCID: PMC6934832.

54. Lubinga JC, Tuppurainen ES, Coetzer JA, Stoltsz WH, Venter EH. Transovarial passage and transmission of LSDV by Amblyomma hebraeum, Rhipicephalus appendiculatus and Rhipicephalus decoloratus. Exp Appl Acarol. 2014 Jan;62(1):67-75. doi: 10.1007/s10493-013-9722-6. Epub 2013 Aug 24. PMID: 23975564.

55. A potential role for ixodid (hard) tick vectors in the transmission of lumpy skin disease virus in cattle E.S.M. Tuppurainen, W.H. Stoltsz , M. Troskie, D.B. Wallace, C.A.L. Oura, P.S. Mellor, J.A.W. Coetzer and E.H. Venter. 2010. Volume58, Issue2. Pages 93-104 https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01184.x.

56. Lumpy Skin Disease. 2016. Hawsar Yasin Abdulqa, Heshu Sulaiman Rahman, Hiewa Othman Dyary and Hemn Hasan Othman. Reproductive Immunology: Vol.1 No.4:25.

57. Alexander RA, Plowright W, Haig DA (1957) Cytopathogenic agents associated with Lumpy-skin Disease of Cattle. Bull Epiz Dis Afr 5: 489–492.

58. Weiss KE (1963) Lumpy skin disease. Emerging diseases of animals. FAO Agric Studies 61: 179–201.

59. Poxviruses (Poxviridae) ; Capripoxviruses. 1999. R. Paul Kitching. Encyclopedia of Virology (Second Edition). Pages 1376-1381 https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0231.

60. Risk Factors for Outbreaks of Lumpy Skin Disease and the Economic Impact in Cattle Farms of Nakuru County, Kenya. Samuel Kipruto Kiplagat, Philip Mwanzia Kitala1 Joshua Orungo, Onono Philippa M. Beard, Nicholas A. Lyons. 2020. Front. Vet. Sci., 29 May 2020. Sec. Veterinary Epidemiology and Economics. Volume 7 - 2020 | https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00259.

61. Lumpy skin disease is expanding its geographic range: A challenge for Asian livestock management and food security. 2022. Shahan Azeem, Banshi Sharma, Shafqat Shabir c, Haroon Akbar, Estelle Venter. The Veterinary Journal. Volume 279, January 2022, 105785. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105785.

62. Epidemiology and diagnostic methods of lumpy skin disease: A Short Review. Chala Guyassa. 2022. International Journal of Veterinary Science and Research. Issue: 2640-7604. DOI: 10.17352/ijvsr.000115.

63. Lumpy skin disease is expanding its geographic range: A challenge for Asian livestock management and food security. Shahan Azeem, Banshi Sharma, Shafqat Shabir, Haroon Akbar, Estelle Venter. The Veterinary Journal. Volume 279, January 2022, 105785. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105785.

64. Babiuk, Shawn, T.R. Bowden, G. Parkyn, B. Dalman, D.M. Hoa, N.T. Long, P.P. Vu, D. X. Bieu, J. Copps, and D.B. Boyle. 2009b. Yemen and Vietnam capripoxviruses demonstrate a distinct host preference for goats compared with sheep. Journal of General Virology 90 (1): 105–114. https://doi.org/10.1099/vir.0.004 507-0.

65. Review of sheep and goat pox disease: current updates on epidemiology, diagnosis, prevention and control measures in Ethiopia Girma Zewdie, Getaw Derese, Belayneh Getachew, Hassen Belay and Mirtneh Akalu. 2021. Animal Diseases. Vol 1:28. https://doi.org/10.1186/s44149-021-00028-2.

66. World Animal Health Information Database (WAHID), 2020: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines (accessed 26 October 2020).

67. Borrel, A., 1902. Expérience sur la filtration du virus claveleux. CR Séanc Soc Biol Paris 54, 59–61

68. Bidre J., 1935. Essais de culture in vitro du virus de la clavelée. Premiers résultats positifs. CR Séanc Soc Biol Paris 119, 502–503.

69. Contribution au contrôle des infections à Capripoxvirus par la vaccination. J.Hamdi. 2021. Thèse; N° Ordre: 2021/13/VETO.

70. Gari, Getachew, G. Mekonnen, D. Sibhat, A. Abebe, M. Sahle, and G. Abie. 2015. Participatory disease surveillance (PDS) of sheep and goats deseases in selected districts of Afar Regional State: Particular focus on Pestes des petit ruminants (PPR) and sheep and goat pox disease (SGP). Ethiopian Veterinary Journal 19 (1): 83–105 Ethiopian Veterinary Association.

71. Development of a Cost-Effective Method for Capripoxvirus Genotyping Using Snapback Primer and dsDNA Intercalating Dye. Esayas Gelaye, Charles Euloge Lamien, Roland Silber, Eeva S. M. Tuppurainen, Reingard Grabherr, Adama Diallo. Plos One. October 2013 | Volume 8 | Issue 10 | e75971.

72. Economic impact of lumpy skin disease and cost effectiveness of vaccination for the control of outbreaks in Ethiopia. 2017. Wassie Molla, Mart C.M. de Jong, Getachew Gari, Klaas Frankena. Preventive Veterinary Medicine. Volume 147, Pages 100-107.

73. Epidemiological Characteristics and Economic Impact of Lumpy Skin Disease, Sheeppox and Goatpox Among Subsistence Farmers in Northeast Nigeria

74. Georgina Limon, Ahmed A. Gamawa, Ahmed I. Ahmed Nicholas A. Lyons, Philippa M. Beard. 2020. Sec. Veterinary Epidemiology and Economics. Volume 7 – 2020. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00008.

75. Green, H. F., 1959: Lumpy skin disease: its effect on hides and leather and a comparison on this respect with some other skin diseases. Bull. Epizoot. Dis. Afr. 7, 63–74.

76. Somasundaram, M. K., 2011: An outbreak of lumpy skin disease in a Holstein Dairy Herd in Oman: a clinical report. Asian J. Anim. Vet. Adv. 6, 851–859.

77. Garner, M. G., and M. B. Lack, 1995: An evaluation of alternate control strategies for foot and mouth disease in Australia – A regional approach. Prev. Vet. Med. 23, 9–32.

78. Aparna M, Gnanavel V, Amit K. Capripoxviruses of small ruminants: current updates and future perspectives. Asian J Anim Vet Adv. 2016;11(12):757–70.

79. Haegeman A, De Vleeschauwer A, De Leeuw I, Vidanović D, Šekler M, Petrović T, Demarez C, Lefebvre D, De Clercq K. Overview of diagnostic tools for Capripox virus infections. Prev Vet Med. 2020 Aug;181:104704. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104704. Epub 2019 May 28. PMID: 31196699.

80. Carneiro AV. Diagnostic characteristics of tests: sensitivity, specificity, predictive values and likelihood ratios. Rev Port Cardiol. 2011 May;30(5):551-8. English, Portuguese. PMID: 21800483.

81. L. Ceccherini-Nelli, Ed., Biomedical Tissue Culture. InTech, 2012. doi: 10.5772/3071

82. World Organisation for Animal Health (OIE) (2018). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals - http,//www.oie.int/standard-setting/terrestrialmanual/access-online/ (accessed 1 August 2018).

83. Binepal, Y.S., Ongadi, F.A., Chepkwony, J.C., 2001. Alternative cell lines for the propagation of lumpy skin disease virus. Onderstepoort J. Vet. Res. 68(2),151-153.

84. Salnikov N., Usadov, T., Kolcov, A., Zhivoderov, S., Morgunov, Y., Gerasimov, V., Gogin A., Titov, I., Yurkov, S., Malogolovkin, A., Kolbasov, D., Lunitsyn, A., 2018. Identification and characterization of lumpy skin disease virus isolated from cattle in the Republic of North Ossetia-Alania in 2015. Transbound Emerg Dis. 65(3):916-920.

85. Atmar RL. Immunological Detection and Characterization. Viral Infections of Humans. 2014 Feb 27:47–62. doi: 10.1007/978-1-4899-7448-8_3. PMCID: PMC7122539.

86. Hosamani M, Nandi S, Mondal B, Singh RK, Rasool TJ, Bandyopadhyay SK. A Vero cell-attenuated Goatpox virus provides protection against virulent virus challenge. Acta Virol. 2004;48(1):15-21. PMID: 15230470.

87. Kuniyal A, Sarkar S, ChandraSekar S, Muthuchelvan D, Pandey AB, Dhama K, Ramakrishnan MA. Coinfection kinetics of goatpox virus and peste-des-petits-ruminants virus in Vero cells. Braz J Microbiol. 2022 Dec;53(4):2309-2314. doi: 10.1007/s42770-022-00801-6. Epub 2022 Jul 27. PMID: 35895274; PMCID: PMC9679053.

88. Process intensification for an enhanced replication of a newly adapted RM-65 sheep pox virus strain in Vero cells grown in stirred bioreactor Khaled Trabelsi, Samy Majoul, Samia Rourou, Héla Kallel. Biochemical Engineering Journal. 2014. Volume: 90 ; pp: 131-139

89. Wang J, Xu Z, Wang Z, Li Q, Liang X, Ye S, Cheng K, Xu L, Mao J, Wang Z, Meng W, Sun Y, Jia K, Li S. Isolation, identification and phylogenetic analysis of lumpy skin disease virus strain of outbreak in Guangdong, China. Transbound Emerg Dis. 2022 Sep;69(5):e2291-e2301. doi: 10.1111/tbed.14570. Epub 2022 Jun 14. PMID: 35478381.

90. Fay PC, Cook CG, Wijesiriwardana N, Tore G, Comtet L, Carpentier A, Shih B, Freimanis G, Haga IR, Beard PM. Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells are a suitable cell line for the propagation and study of the bovine poxvirus lumpy skin disease virus. J Virol Methods. 2020 Nov;285:113943. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113943. Epub 2020 Jul 22. PMID: 32707050; PMCID: PMC7561597.

91. Propagation and Growth Kinetics of Sheep Pox Vaccine Virus in MDBK Cells. Serdar Uzar, Nuri Turan.2022. Acta Veterinaria Eurasia 48(3). DOI: 10.5152/actavet.2022.21082.

92. ECACC General Cell Collection: MDBK, cat no 90050801

93. Singh B, Rai A. Virion polypeptides of sheep poxvirus. Indian Vet Med J 1991;15(4):239–44.

94. Lubinga, J.C., Tuppurainen, E.S., Coetzer, J.A., Stoltsz, W.H., Venter, E.H., 2014. Transovarial passage and transmission of LSDV by Amblyomma hebraeum, Rhipicephalus appendiculatus and Rhipicephalus decoloratus. Exp. Appl. Acarol. 62(1), 67-75.

95. El-Kenaway and El-Tholoth. 2011. Lumpy skin disease virus identification in different tissues of naturally infected cattle and chlorioallantoic membrane of emberyonated chicken eggs using immunofluorescen, immunoperoxidase techniques and polymerase chain reaction. Int. J.Virol. 7 (4),158-166.

96. El-Nahas, E.M., El-Habbaa, A.S., El-bagoury, G.F., Radwan, M.E.I., 2011. Isolation and Identification of Lumpy Skin Disease Virus from Naturally Infected Buffaloes at Kaluobia, Egypt. Global Veterinaria 7(3), 234-237.

97. Verma, S., Verma, .LK., Gupta, V.K., Katoch, V.C., Dogra, V., Pal, B., Sharma, M., 2011. Emerging Capripoxvirus disease outbreaks in Himachal Pradesh, a northern state of India. Transbound. Emerg. Dis. 58(1),79-85.

98. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bull World Health Organ. 1976;54(2):129-39. PMID: 798633; PMCID: PMC2366430.

99. Sharma B, Negi BS, Pandey AB, Bandyopadhyay SK, Shankar H, Yadav MP. Detection of goat pox antigen and antibody by the counter immunoelectrophoresis test. Trop Anim Health Prod. 1988 May;20(2):109-13. doi: 10.1007/BF02242237. PMID: 2840760.

100. Carn, V.M., 1995. An antigen trapping ELISA for the detection of capripoxvirus in tissue culture supernatant and biopsy samples. J. Virol. Methods. 51(1),95-102.

101. Chand, P., 1992. Molecular and immunological characterization of amajor envelope protein of capripoxvirus. Ph.D. Thesis. University of Surrey, Surrey, UK.

102. Ngichabe, C.K., Binepal, Y.S., Njiru, J.W., Carn, V.M., 1999. Evaluation of an immunocapture enzymelinked immunosorbent assay for detection of capripoxviruses. Vet. Rec. 145, 231-232.

103. Rao, T.V.S., Negi, B.S., Dhar, P., Asgola, D., 1996. Evaluation of latex agglutination test for rapid detection of goat poxvirus antigen and antibodies. Acta Virol.40, 95–97.

104. Balamurugan, V., Jayappa, K.D., Hosamani, M., Bhanuprakash, V., Venkatesan, G., Singh, R.K., 2009. Comparative efficacy of conventional and taqman polymerase chain reaction assays in the detection of capripoxviruses from clinical samples. J. Vet. Diagn Invest. 21(2),225-23.

105. Babiuk, S., Wallace, D.B., Smith, S.J., Bowden, T.R., Dalman, B., Parkyn, G., Copps, J., Boyle, D.B., 2009. Detection of antibodies against capripoxviruses using an inactivated sheeppox virus ELISA. Transbound. Emerg. Dis. 56(4),132-141.

106. Ochwo S, VanderWaal K, Munsey A, Nkamwesiga J, Ndekezi C, Auma E, Mwiine FN. Seroprevalence and risk factors for lumpy skin disease virus seropositivity in cattle in Uganda. BMC Vet Res. 2019 Jul 8;15(1):236. doi: 10.1186/s12917-019-1983-9. PMID: 31286926; PMCID: PMC6615106.

107. Ebrahimi-Jam MH, Keyvanfar H, Varshovi HR, Seyfi Abad Shapoori MR, Lotfi M. Development and Evaluation of an Indirect Capripoxvirus ELISA Based on Truncated P32 Protein Expressed in *E. coli*. Arch Razi Inst. 2021 Sep 1;76(3):471-485. doi: 10.22092/ari.2020.343355.1501. PMID: 34824741; PMCID: PMC8605838.

108. Kitching, R. P., Hammond, J. M. & Black, D. N. PCR in cell cultures. Journal of Virological Methods (1986). Studies on the major precipitating antigens 77, 75–9. of capripoxviruses. Journal of General Virology 67, 8. Markoulatos, P., Samara, V., Siafakas, N., Plakokefalos, 199–248.

109. Mangana-Vougiouka, O., Markoulatos, P., Koptopoulos, G., Nomikou, K., Bakandritsos, N., Papadopoulos, P., 2000. Sheep poxvirus identification from clinical specimens by PCR, cell culture, immunofluorescence and agar gel immunoprecipitation assay. Mol Cell Probes. 14(5),305-310.

110. Chand, P., Kitching, R.P., Black, D.N., 1994. Western blot analysis of virus-specific antibody responses for capripox and contagious pustular dermatitis viral infections in sheep. Epidemiol. Infect. 113(2),377-385.

111. Sharma B, Negi BS, Pandey AB, Bandyopadhyay SK, Shankar H and Yadav MP (1988). Detection of goat pox antigen and antibody by the CIE test. Tropical Animal Health and Sprygin A., Pestova Y., Prutnikov P., Kononov A. Detection of vaccine-like lumpy skin disease virus in cattle and Musca domestica L. flies in an outbreak of lumpy skin disease in Russia in 2017. Transbound. Emerg. Dis. 2018 Jun 22.

112. Rao, T.V.S, Negi, B.S., Bansal, M.P., 1997b. Use of purified soluble antigens of sheep poxvirus in serodiagnosis. Indian J. Anim. Sci. 67, 642–645.

113. Kyriakidou A, Kourea-Kremastinou T, Papaevangelou G, Vassiliadis P. Detection of vaccinia antigen and antibody by counterelectrophoresis. Pathol Microbiol (Basel). 1973;39(2):126-34. doi: 10.1159/000162640. PMID: 4196961.

114. Varshovi, H.R., Norian, R., Azadmehr, A., Ahangaran, N.A., 2021. Immune response Characteristics of Capri Pox Virus Vaccines Following Emergency Vaccination of Cattle Against Lumpy Skin Disease Virus. https://doi.org/10.22067/veterinary. v9i2.65381.

115. Fentie, T., Fenta, N., Leta, S., Molla, W., Ayele, B., Teshome, Y., Nigatu, S., Assefa A., 2017. Sero-prevalence, risk factors and distribution of sheep and goat pox in Amhara Region, Ethiopia. BMC Vet Res. 13(1):385.

116. Molla, W., Frankena, K., Gari, G., Kidane, M., Shegu, D., de Jong M.C.M., 2018. Seroprevalence and risk factors of lumpy skin disease in Ethiopia. Prev Vet Med. 160:99-104.

117. Tilahun, Z. Berecha, B., Simenew K., Reta, D., 2014. Towards Effective Vaccine Production, A Controlled Field Trial on the Immunological Response of Three Lumpy Skin Disease Vaccine Strains in Dairy Farms. Acad. J. Anim. Dis. 3(3), 17-26.

118. Bhanuprakash V., Hosamani, M., Sominder Juneja, Nitul Kumar, Singh, R.K., 2006. Detection of Goat pox Antibodies, Comparative Efficacy of Indirect ELISA and Counterimmunoelectrophoresis, J. Appl. Anim. Res. 30,2, 177-180.

119. Bhanot, V., Balamurugan, V., Bhanuprakash, V., Venkatesan, G., Sen, A., Yadav, V., Yogisharadhya, R., Singh, R.K., 2009. Expression of P32 protein of goatpox virus in Pichia pastoris and its potential use as a diagnostic antigen in ELISA. J. Virol. Methods. 162(1- 2),251-257.

120. Bowden, T.R., , Babiuk, S.L, Parkyn, G.R., Copps, J.S., Boyle, D.B., 2008. Capripoxvirus tissue tropism and shedding, A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. Virology. 371(2),380-393.

121. Davies, F.G., 1982. Observations on the epidemiology of lumpy skin disease in Kenya. J. Hyg. (Lond). 88(1),95-102.

122. Abera, Z., Degefu, H., Gari, G., Kidane, M., 2015. Sero-prevalence of lumpy skin disease in selected districts of West Wollega zone, Ethiopia. BMC Vet. Res. 17;11,135.

123. Gari, G., Biteau-Coroller, F., LeGoff, C., Caufour, P., Roger, F., 2008. Evaluation of indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the diagnosis and screening of lumpy skin disease using Bayesian method. Vet. Microbiol. 129(3 ACCEPTED MANUSCRIPT -4),269-280.

124. Al-Hyali MH, Al-Zughaibi AB, Abdulkarim S. Cytopathogenicity studied of fowl pox virus by using indirect immunoperoxidase and acridine orange tests. Iraqi J Vet Medi. 2005;29(2):12-20.

125. Batista HB, Lima FE, Maletich D, Silva AC, Vicentini FK, Roehe LR, Spilki FR, Franco AC, Roehe PM. Immunoperoxidase inhibition assay for rabies antibody detection. J Virol Methods. 2011 Jun;174(1-2):65-8. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.03.025. Epub 2011 Mar 31. PMID: 21458492.

126. Direksin K, Joo H, Goyal SM. An immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies against swine influenza virus. J Vet Diagn Invest. 2002 Mar;14(2):169-71. doi: 10.1177/104063870201400215. PMID: 11939342.

127. Gerber PF, Matos AC, Guedes MI, Madureira MC, Silva MX, Lobato ZI. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay for total anti-Vaccinia virus antibody titration. J Vet Diagn Invest. 2012 Mar;24(2):355-8. doi: 10.1177/1040638711435231. PMID: 22379052.

128. Pileri E, Cortey M, Rodríguez F, Sibila M, Fraile L, Segalés J. Comparison of the immunoperoxidase monolayer assay and three commercial ELISAs for detection of antibodies against porcine circovirus type 2. Vet J. 2014 Sep;201(3):429-32. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.05.025. Epub 2014 May 22. PMID: 24928421.

129. Carmina G, Nieto R, Arias M. Indirect Immunoperoxidase Test (IPT) for Detection of Antibodies Against African Swine Fever Virus (ASFV) on African Green Monkey Cell Lines (Vero, MS). Methods Mol Biol. 2022;2503:147-158. doi: 10.1007/978-1-0716-2333-6_10. PMID: 35575892.

130. Ireland, D.C. and Binepal, Y.S., 1998. Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. J. Virol. Methods. 74(1),1-7.

131. Tuppurainen, E.S., Venter, E.H., Coetzer, J.A., 2005. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. Onderstepoort J. Vet. Res. 72(2),153-164.

132. Mangana-Vougiouka, O., Markoulatos, P., Koptopoulos, G., Nomikou, K., Bakandritsos, N., Papadopoulos, O., 1999. Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures. O. J. Virol. Methods. 77(1),75-79.

133. Markoulatos, P., Mangana-Vougiouka, O., Koptopoulos, G., Nomikou, K., Papadopoulos, O., 2000. Detection of sheep poxvirus in skin biopsy samples by a multiplex polymerase chain reaction. J. Virol. Methods. 84(2),161-167.

134. Tageldin, M.H., Wallace, D.B., Gerdes, G.H., Putterill, J.F., Greyling, R.R., Phosiwa, M.N., Al Busaidy, R.M., Al Ismaaily, S.I., 2014. Lumpy skin disease of cattle, an emerging problem in the Sultanate of Oman. Trop Anim Health Prod. 46(1),241-246.

135. Zhao, Z., Wu, G., Yan, X., Zhu, X., Li, J., Zhu, H, Zhang, Z., Zhang, Q., 2017. Development of duplex PCR for differential detection of goatpox and sheeppox viruses. BMC Vet. Res. 13(1),278.

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

137. Lamien, C.E., Le Goff, C., Silber, R., Wallace, D.B., Gulyaz, V., Tuppurainen, E., Madani, H., Caufour, P., Adam, T., El Harrak M., Luckins, A.G., Albina, E., Diallo, A., 2011a. Use of the Capripoxvirus homologue of Vaccinia virus 30 kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target, development of a classical PCR method to differentiate Goat poxvirus from Sheep poxvirus. Vet. Microbiol. 149(1-2),30-39.

138. G., Balamurugan, V., Bhanuprakash, V., 2014a. Multiplex PCR for simultaneous detection and differentiation of sheeppox, goatpox and orf viruses from clinical samples of sheep and goats. J. Virol. Methods. 195 ACCEPTED MANUSCRIPT ,1-8.

139. Balinsky, C.A., Delhon, G., Smoliga, G., Prarat, M., French, R.A., Geary, S.J., Rock, D.L., Rodriguez, L.L., 2008. Rapid preclinical detection of sheeppox virus by a real-time PCR assay. J. Clin. Microbiol. 46(2),438-442.

140. Stubbs, S., Oura, C.A., Henstock, M., Bowden, T.R., , King, D.P., Tuppurainen, E.S., 2012. Validation of a high-throughput real-time polymerase chain reaction assay for the detection of capripoxviral DNA. J. Virol. Methods. 179(2),419-422.

141. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* **28**, E630

142. Das, A., Babiuk, S., McIntosh, M.T., 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of capripoxviruses. J Clin Microbiol. 50(5),1613-1620.

143. Lobato IM, O'Sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. Trends Analyt Chem. 2018 Jan;98:19-35. doi: 10.1016/j.trac.2017.10.015. Epub 2017 Oct 26. PMID: 32287544; PMCID: PMC7112910.

144. Shalaby MA, El-Deeb A., El-Tholoth M., Hoffmann D, Czerny CP, Hufert FT, Weidmann M., Abd El Wahed A. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of lumpy skin disease virus. BMC Vet Res. 2016 Nov 2;12(1),244.

145. Yang, Y., Qin, X., Zhang, X., Zhao, Z., Zhang, W., Zhu, X., Cong, G., Li, Y., Zhang, Z., 2017. Development of real-time and lateral flow dipstick recombinase polymerase amplification assays for rapid detection of goatpox virus and sheeppox virus. Virol. J. 14(1),131.

146. Awad, W.S., Ibrahim, A.K., Mahran, K., Fararh, K.M., Abdel Moniem, M.I., 2010. Evaluation of different diagnostic methods for diagnosis of Lumpy skin disease in cows. Trop. Anim. Health Prod. 42(4),777-783.

147. Rao, T.V.S. and Negi, B.S. 1997. Evaluation of different serological tests for the diagnosis of goat pox using soluble antigens. Trop. Anim. Health Prod. 29, 235–239.

148. Gulbahar MY, Cabalar M, Gul Y, Icen H. Immunohistochemical detection of antigen in lamb tissues naturally infected with sheeppox virus. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2000 Apr;47(3):173-81. doi: 10.1046/j.1439-0450.2000.00321.x. PMID: 10829571.

149. Mirzaie, K., Barani, S. M. & Bokaie, S., 2015. A review of sheep pox and goat pox: perspective of their control and eradication in Iran. J. Adv. Vet. Anim. Res. 2(4), 373– 381.

150. J.Hamdi, Munyanduki, H, Omari Tadlaoui, K., El Harrak, M., Fassi Fihri, O. Capripoxvirus Infections in Ruminants: A Review. Microorganisms 2021 2. J.Hamdi, Z.Bamouh, M. Jazouli, M. Alhyane, N. Safini, K. Omari Tadlaoui, O.

151. Chi-Chung Cheng V, Fuk-Woo Chan J, FN Hung I, Yuen KY. Viral Infections, an Overview with a Focus on Prevention of Transmission. Reference Module in Biomedical Sciences. 2016:B978-0-12-801238-3.90174-0. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.90174-0. Epub 2016 Mar 2. PMCID: PMC7157453.

152. Tuppurainen E, Dietze K, Wolff J, Bergmann H, Beltran-Alcrudo D, Fahrion A, Lamien CE, Busch F, Sauter-Louis C, Conraths FJ, De Clercq K, Hoffmann B, Knauf S. Review: Vaccines and Vaccination against Lumpy Skin Disease. Vaccines (Basel). 2021 Oct 6;9(10):1136. doi: 10.3390/vaccines9101136. PMID: 34696244; PMCID: PMC8539040.

153. Wallace D.B., Viljoen G.J. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine.* 2005;23:3061–3067. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.10.006. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

154. Kitching R.P. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. In: Brown F., Roth J., editors. *Vaccines for OIE List A and Emerging Animal Diseases, Proceedings of a Symposium, Ames, Iowa, USA, 16–18 September 2002: Proceedings (Developments in Biologicals, Vol. 114)* S. Karger; Basel, Switzerland: 2013. pp. 161–167. [Google Scholar]

155. Gari G., Abie G., Gizaw D., Wubete A., Kidane M., Asgedom H., Bayissa B., Ayelet G., Oura C.A.L., Roger F., et al. Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus. *Vaccine.* 2015;33:3256–3261. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.01.035. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

156. Ben-Gera J., Klement E., Khinich E., Stram Y., Shpigel N.Y. Comparison of the efficacy of Neethling lumpy skin disease virus and x10RM65 sheep-pox live attenuated vaccines for the prevention of lumpy skin disease—The results of a randomized controlled field study. *Vaccine.* 2015;33:4837–4842. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.071. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

157. Zhugunissov K., Bulatov Y., Orynbayev M., Kutumbetov L., Abduraimov Y., Shayakhmetov Y., Taranov D., Amanova Z., Mambetaliyev M., Absatova Z., et al. Goatpox virus (G20-LKV) vaccine strain elicits a protective response in cattle against lumpy skin disease at challenge with lumpy skin disease virulent field strain in a comparative study. *Vet. Microbiol.* 2020;245:108695. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108695. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

158. Hamdi J., Boumart Z., Daouam S., El Arkam A., Bamouh Z., Jazouli M., Tadlaoui K.O., Fihri O.F., Gavrilov B., El Harrak M. Development and Evaluation of an Inactivated Lumpy Skin Disease Vaccine for Cattle. *Vet. Microbiol.* 2020;245:108689. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108689. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

159. Wolff J., Moritz T., Schlottau K., Hoffmann D., Beer M., Hoffmann B. Development of a Safe and Highly Efficient Inactivated Vaccine Candidate against Lumpy Skin Disease Virus. *Vaccines.* 2021;9:4. doi: 10.3390/vaccines9010004. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

160. Kitching, R.P., 2003. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. Dev Biol (Basel) 114, 161–7.

161. Awad, M., Michael, A., Soliman, S.M., Samir, S.S. and Daoud, A.M., 2003. Trials for preparation of inactivated sheep pox vaccine using binary ethyleneimine. Egyptian Journal of Immunology, 10, 67-72.

162. Boumart,, Z., Daouam, S., Belkourati, I., Rafi, L., Tuppurainen, E., Omari Tadlaoui, K., El Harrak, M., 2016. Comparative innocuity and efficacy of live and inactivated sheeppox vaccines. BMC Vet. Res. 12 (1), 133.

163. Boue A, Balatazard M, Vieuchange J. Culture du virus de is clavelae sur cultures de tissues. CR Acad Sci 1957;244:1571–3.

164. Lang R, Leftheriotis E. Adaptation of sheep poxvirus to sheep kidney cells. Bull Acad Vet Fr 1961;34: 337–43.

165. Aygun ST. The propagation of variola ovina virus in sheep embryonic tissue cultures and usefulness as vaccine against this disease. Arch Exp Vet Med 1955;9:415–41.

166. Koylu A, Nanda SM. The cultivation of sheep poxvirus on sheep embryo skin cells. Pandik Vet Kont Arastirma Enstit Derg 1970;3:88–99.

167. Manual OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4th ed.; 2000 [chapter 2.1.10].

168. Bhanuprakash V, Indrani BK, Moorthy ARS, Krishnappa G. Isolation, purification and comparison of protein profiles of sheep poxviruses. Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis 2003;24(1):15–20

169. Soman JP, Singh IP. Cytopathic and immunogenic studies of sheep poxvirus serially cultivated in cell culture. J Comp Pathol 1980;90:99–106.

170. Anandan R, Sundara Rajan S, Ramani K. Further studies on adaptation of sheep poxvirus in sheep thyroid and sheep kidney monolayers. Indian Vet J 1976;53:577–81.

171. Kirubharan JJ, Sugirtha PGA, Padmanaban VD. Adaptation of sheep poxvirus (Ranipet strain) to BHK 21 cell line. Indian Vet J 1993;70(1):4–6.

172. Sundara Rajan S, Anandan R, Kannamani G, Jayaraman MS. Studies on sheep poxvirus propagated in cell cultures. Cherian 1973;2:1–8.

173. Ramyar H, Hessami M. Development of an attenuated live virus vaccine against sheep pox. Zentralblatt fur Vetmed 1967;14B:516–9.

174. Lang R, Leftheriotis E. Adaptation of sheep poxvirus to sheep kidney cells. Bull Acad Vet Fr 1961;34: 337–43.

175. Gunenko VV, Syurin VN. Comparative study of the genetic characteristics of animal poxviruses. I. Pathogenicity and immunogenic properties. II. Susceptibility of cultured tissues and chick embryo chorioallantois. III. Heat resistance and haemagglutination activity. Vop Vet Virusol 1966;2:375–91.

176. Edlinger E, Iftimovirci M. Study on the multiplication of sheep pox virus on ovine cell cultures. Arch de 1'Inst Past de Tunis 1973;60:373–6

177. Pandey AK, Malik BS, Bansal MP. Studies on sheep pox virus. I. Adaptation and propagation of the virus in cell culture. Indian Vet J 1969;46:925–9.

178. Davies FG. Characteristics of a virus causing a pox disease in sheep and goats in Kenya with observations on the epidemiology and control. J Hyg 1976;76(2):163–71.

179. Das SK, Mallick BB. Evolving of live modified sheep pox viral strains: modification of indigenous viral strains. Indian J Exp Biol 1986;24:282–6.

180. Romanenko VF. Propagation and cytopathic action of sheep poxvirus in tissue culture. Trudy Vseso Inst Eksp noi Vet 1961;27:51–6.

181. Aygun ST. The propagation of variola ovina virus in sheep embryonic tissue cultures and usefulness as vaccine against this disease. Arch Exp Vet Med 1955;9:415–41.

182. Vigario JD, Ferraz FP. Study of sheep poxvirus synthesis by fluorescent antibody technique. Am J Vet Res 1967;28:809–13.

183. Kumar N, Chander Y, Kumar R, Khandelwal N, Riyesh T, Chaudhary K, Shanmugasundaram K, Kumar S, Kumar A, Gupta MK, Pal Y, Barua S, Tripathi BN. Isolation and characterization of lumpy skin disease virus from cattle in India. PLoS One. 2021 Jan 11;16(1):e0241022. doi: 10.1371/journal.pone.0241022. PMID: 33428633; PMCID: PMC7799759.

184. Martin WB, Ergin H, Koylu A. Tests in sheep of attenuated sheep pox vaccines. Res Vet Sci 1973;14: 53–61.

185. Plowright W, Ferris RD. The growth and cytopathogenicity of sheep pox virus in tissue culture. Br J Exp Pathol 1958;38:424–35.

186. Skalinskii EI. Cytological changes in tissue cultures infected with sheep poxvirus. Turdy Nauchne Kentrol Inst Vet Preparatov 1962;10:110–7.

187. Mateva V. Culture of the 'Perego' strain of sheep poxvirus in a heterologous tissue and its properties. Veterinarriorneditsinski-Nauki 1976;13(8):11–17

188. Likhachev NV, Zhidkova LA. Propagation of sheep pox virus in cell cultures. Dokl Veses Acad Sel Khoz Nauk 1972;11:20–2.

189. Tozzini F, Salim HA, Abdijabar HD, Abdulcadir AF. Growth characterstics of vaccine strains of Rinderpest virus and ovine poxvirus subcultures of bovine fetal lung fibroblasts. Arch Vet Ital 1987;38(1): 9–12.

190. Davies FG, Mbugwa G. The alterations in pathogenicity and immunogenicity of Kenyan sheep and goat poxviruses on serial passages in bovine fetal muscle cell cultures. J Comp Pathol 1985;95(4):565–72.

191. Liang Z, Yao K, Wang S, Yin J, Ma X, Yin X, Wang X, Sun Y. Understanding the research advances on lumpy skin disease: A comprehensive literature review of experimental evidence. Front Microbiol. 2022 Nov 28;13:1065894. doi: 10.3389/fmicb.2022.1065894. PMID: 36519172; PMCID: PMC9742232.

192. Romanenko VF, Gavrilov VK. Adaptation of sheeppox virus to cultures of mouse embryo cells of line KEM-La. Vopy Virusol 1963;8(2):48–52.

193. Singh B, Rai A. Virion polypeptides of sheep poxvirus. Indian Vet Med J 1991;15(4):239–44.

194. Ganju AK, Shukla DC, Chawla SK. Replication and cellular reaction of certain DNA and RNA viruses in established cell lines. Indian J Anim Sci 1977;47(9):582–6.

195. **326.** David J. Pollard, Alain Pralong, Chapter 35 - Single-Use Technology Implementation For Biologics and Vaccines Production, Biopharmaceutical Processing, 2018, Pp: 721-740,

ISBN 9780081006238, https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00035-9.

196. Meena Krishania, Raveendran Sindhu, Parameswaran Binod, Vivek Ahluwalia, Vinod Kumar, Rajender Singh Sangwan, Ashok Pandey, Chapter 5 - Design of Bioreactors in Solid-State Fermentation, Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, 2018, Pp: 83-96, ISBN 9780444639905, https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00005-0.

197. Chen-Collins AR, Dixon DW, Vzorov AN, Marzilli LG, Compans RW. Prevention of poxvirus infection by tetrapyrroles. BMC Infect Dis. 2003 May 28;3:9. doi: 10.1186/1471-2334-3-9.

198. Fakri, Fatima Zohra et al. "Development and field application of a new combined vaccine against Peste des Petits Ruminants and Sheep Pox." *Trials in Vaccinology* 4, 2015: 33-37. DOI:10.1016/J.TRIVAC.2015.03.004.

199. Kenneth P. Clapp, Andreas Castan, Eva K. Lindskog, Chapter 24 - Upstream Processing Equipment, Editor(s): Günter Jagschies, Eva Lindskog, Karol Łącki, Parrish Galliher,Biopharmaceutical Processing, 2018, Pp: 457-476, ISBN 9780081006238, https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00024-4.

200. The effectiveness of glass beads for plating cell cultures, Alidivinas Prusokas, Michelle Hawkins, Conrad A. Nieduszynski, Renata Retkute. bioRxiv 241752;2021. doi: https://doi.org/10.1101/241752.

201. Mazzei, D., Guzzardi, M. A., Giusti, S., and Ahluwalia, A. (2010). A low shear stress modular bioreactor for connected cell culture under high flow rates. Biotechnol. Bioeng. 106 (1), 127–137. doi:10.1002/bit.22671

202. Pascale, B., Jacques, P.T., Marie-France, P. (2001) J. Biotechnol. 91, 63-74 morphogenetic protein-2 microcarriers fabricated by the cryopolymerization of gelatin methacrylate for the treatment of radial fracture in two dogs. In Vivo 32:575–581. https://doi.org/10.21873/invivo.11278

203. Wang, D.L., Xiao, C.Z., Chen, Z.L., Huang, Z.C. (1996) Chinese J. Biotechnol. 12(2), 119-129.

204. Process intensification for an enhanced replication of a newly adapted RM-65 sheep pox virus strain in Vero cells grown in stirred bioreactor,Trabelsi, Khaled Majoul, Samy Rourou, Samia Kallel, Héla Biochemical Engineering Journal, volume : 90, PP:131-139, 2014. DOI:10.1016/J.BEJ.2014.06.001.

205. Wang Y, Zhang Y, Li N, Chen L, Zhang D, Sun D, Li S, Guo X, Ma X. Stirring rate regulates the proliferation and metabolism of microencapsulated recombinant CHO cells. Biotechnol Appl Biochem. 2015 Nov-Dec;62(6):833-9. doi: 10.1002/bab.1333. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25524589

206. Kratje, R. B. and Wagner, R. (1992) Biotechnol. Bioeng. 39,233–242

207. Preissmann, A., Wiesmann, R., Buchholz, R., Werner, R. G. andNoe, W. (1997) Cytotechnology 24, 121–134

208. Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells, Warnock, James N. Al-Rubeai, Mohamed, Biotechnology and Applied Biochemistry, volume: 45, 2006 DOI:10.1042/BA20050233

209. Wright, B., Bruninghaus, M., Vrabel, M., Walther, J., Shah, N., Bae, S.-A., Johnson, T.,Yin, J., Zhou, W., Konstantinov, K., 2015. A Novel Seed-train Process: Using High-density Cell Banking, a Disposable Bioreactor, and Perfusion Technologies. In: https://bioprocessintl.com/upstream-processing/upstream-single-use-technologies/novel-seed-train-process-using-high-density-cell-banking-disposable-bioreactor-perfusion-technologies/.Wu, P., Ozturk, S.S.

210. Calabro, V., Curcio, S., Iorio, G. (2002) J. Membrane Sci. 206, 217-241.

211. Knazek RA, Gullino PM, Kohler PO, Dedrick RL (1972) Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro. Science 178:65–66

212. Hollow Fiber Bioreactor Technology for Tissue Engineering Applications. Hadis Eghbali, Michele, M. Nava michelet, Davod Mohebbi-Kalhori, and Manuela T. Raimondi. 2016. Volume 39, Issue 1. https://doi.org/10.5301/ijao.5000466

213. Flendrig LM, La Soe JW, Joerning GGA et al (1997) In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyestermatrix for hepatocyte culture as small aggregates. J Hepatol 26:1379–1392

214. Bielser, J. M., Wolf, M., Souquet, J., Broly, H., & Morbidelli, M. (2018). Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing—A critical review. Biotechnology Advances, 36(4), 1328–1340. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.011

215. Separation and quantification of monoclonal-antibody aggregates by hollow-fiber-flow field-flow fractionation Jun Fukuda & Takafumi Iwura & Shigehiro Yanagihara & Kenji Kano. 2014. Anal Bioanal Chem : 406:6257–6264. DOI 10.1007/s00216-014-8065-4

216. Nikolay A, de Grooth J, Genzel Y, Wood JA, Reichl U. Virus harvesting in perfusion culture: Choosing the right type of hollow fiber membrane. Biotechnol Bioeng. 2020 Oct;117(10):3040-3052. doi: 10.1002/bit.27470. Epub 2020 Jul 2. PMID: 32568408.

217. H_2 Permeation Through Pd-Based Membranes. Volkov, V.V. 2016. In: Drioli, E., Giorno, L. (eds) Encyclopedia of Membranes. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44324-8_1040

218. Mitteregger R, Vogt G, Rossmanith E, Falkenhagen D. Rotary cell culture system (RCCS): a new method for cultivating hepatocytes on microcarriers. Int J Artif Organs. 1999 Dec;22(12):816-22. PMID: 10654878.

219. McGowin, C.L.; Radtke, A.L.; Abraham, K.; Martin, D.H.; Herbst-Kralovetz, M. Mycoplasma genitalium infection activates cellular host defense and inflammation pathways in a 3-dimensional human endocervical epithelial cell model. *J. Infect. Dis.* **2013**, *207*, 1857–1868. [**Google Scholar**] [**CrossRef**] [**PubMed**]

220. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer – a review Jong Bin Kim, Robert Stein, and Mike J. O'Hare.2004. Breast Cancer Research and Treatment 85: 281–291. DOI: 10.3892/ijo.2021.5176

221. **352.** Radtke, A.L.; Herbst-Kralovetz, M.M. Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3d epithelial cell models. *J. Vis. Exp.* **2012**. [**Google Scholar**] [**CrossRef**] [**PubMed**]

222. Molina-Jimenez, F.; Benedicto, I.; Dao Thi, V.L.; Gondar, V.; Lavillette, D.; Marin, J.J.; Briz, O.; Moreno-Otero, R.; Aldabe, R.; Baumert, T.F.; et al. Matrigel-embedded 3D culture of Huh-7 cells as a hepatocyte-like polarized system to study hepatitis C virus cycle. *Virology* **2012**, *425*, 31–39. [**Google Scholar**] [**CrossRef**] [**PubMed**]

223. David, J.; Sayer, N.M.; Sarkar-Tyson, M. The use of a three-dimensional cell culture model to investigate host-pathogen interactions of francisella tularensis in human lung epithelial cells. *Microbes Infect.* **2014**, *16*, 735–745. [**Google Scholar**] [**CrossRef**] [**PubMed**]

224. Bag Bioreactor Based on Wave-Induced Motion: Characteristics and Applications Regine Eibl, Sören Werner, and Dieter Eibl. 2009. Adv Biochem Engin/Biotechnol. Volume:115: 55–87 DOI: 10.1007/10_2008_15.

225. Laderman K, Quezada V, Dunphy N, Anderson J, Derecho J, McMahom R, Hsu D, Couture L (2007) DNA production in the Wave Bioreactor under cGMP conditions. http://www.wavebiotech.com/pdfs/press/pDNA_Poster_COH2007.pfd. Access

226. ibl R, Eibl D (2006) Disposable bioreactors for pharmaceutical research and manufacturing. Proceedings second international conference on bioreactor technology in cell, tissue culture and biomedical applications. Saariselkä, Finland

227. Goodwin, T.J.; Schroeder, W.F.; Wolf, D.A.; Moyer, M.P. Rotating-wall vessel coculture of small intestine as a prelude to tissue modeling: Aspects of simulated microgravity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1993**, *202*, 181–192. [**Google Scholar**]

228. Packed-bed bioreactors for mammalian cell culture: Bioprocess and biomedical applications. F. Meuwly, P.-A. Ruffieux, A. Kadouri, U. von Stockar. 2007. Biotechnology Advances. Volume: 25: 45–56.

229. Huang KS, Lo WH, Chung YC, Lai YK, Chen CY, Chou ST, et al. Combination of baculovirus-mediated gene delivery and packed-bed reactor for scalable production of adeno-associated virus. Hum Gene Ther. 2007;18(11):1161–70. 5.

230. Toriniwa H, Komiya T. Japanese encephalitis virus production in Vero cells with serum-free medium using a novel oscillating bioreactor. Biologicals. 2007;35(4):221–6. 6.

231. Hu YC, Te Lu J, Chung YC. High-density cultivation of insect cells and production of recombinant baculovirus using a novel oscillating bioreactor. Cytotechnology. 2003;42(3):145–53.

232. (PDF) Production of Bovine Herpesvirus-1 Vaccine Strains in MDBK Cells Using BelloCell Bioreactor [Internet]. [cited 2020 Jun 1]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/291689324_Production_of_ Bovine_Herpesvirus-1_Vaccine_Strains_in_MDBK_Cells_Using_BelloCell_ Bioreactor 8.

233. Lai C-C, Weng TC, Tseng YF, Chiang JR, Lee MS, Hu AYC. Evaluation of novel disposable bioreactors on pandemic influenza virus production. PLoS One. 2019;14(8):e0220803. 9.

234. Ho L, Greene CL, Schmidt AW, Huang LH. Cultivation of HEK 293 cell line and production of a member of the superfamily of G-protein coupled receptors for drug discovery applications using a highly efficient novel bioreactor. Cytotechnology. 2004;45(3):117–23. 10.

235. Chen XC, Liu H, Li H, Cheng Y, Yang L, Liu YF. In vitro expansion and differentiation of rat pancreatic duct-derived stem cells into insulin secreting cells using a dynamic three-dimensional cell culture system. Genet Mol Res. 2016;15(2). 11.

236. Wang IK, Hsieh SY, Chang KM, Wang YC, Chu A, Shaw SY, et al. A novel control scheme for inducing angiostatin-human IgG fusion protein production using recombinant CHO cells in a oscillating bioreactor. J Biotechnol. 2006;121(3):418–28

237. Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor Gonc¸alo J.M. Cabrita1 , Bruno S. Ferreira, Cla´udia Lobato da Silva, Raquel Gonc¸alves, Grac¸a Almeida-Porada, and Joaquim M.S. Cabral. 2003. TRENDS in Biotechnology Vol.21 No.5.

238. Chapter 9 - Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro, Charis-P. Segeritz, Ludovic Vallier, 2017. Basic Science Methods for Clinical Researchers, Academic Press. Pages 151-172. ISBN 9780128030776. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6.

239. Hamdi J, Boumart Z, Daouam S, El Arkam A, Bamouh Z, Jazouli M, Tadlaoui KO, Fihri OF, Gavrilov B, El Harrak M. Development and Evaluation of an Inactivated Lumpy Skin Disease Vaccine for Cattle. Vet Microbiol. 2020 Jun;245:108689. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108689. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32456824.

240. Comparative innocuity and efficacy of live and inactivated sheeppox vaccines Zineb Boumart, Samira Daouam, Imane Belkourati, Lamya Rafi, Eeva Tuppurainen, Khalid Omari Tadlaoui, Mehdi El Harrak. 2016. BMC Veterinary Research. 12:133 DOI 10.1186/s12917-016-0754-0.

241. Schwartz MA, Both G, Lechene C. Effect of cell spreading on cytoplasmic pH in normal and transformed fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:4525–9

242. Michl J, Park KC, Swietach P. Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. Commun Biol. 2019 Apr 26;2:144. doi: 10.1038/s42003-019-0393-7. PMID: 31044169; PMCID: PMC6486606.

243. Zhang L, Castan A, Stevenson J, Chatzissavidou N, Vilaplana F, Chotteau V. Combined effects of glycosylation precursors and lactate on the glycoprofile of IgG produced by CHO cells. J Biotechnol. 2019 Jan 10;289:71-79. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.11.004. Epub 2018 Nov 10. PMID: 30423367.

244. Grein TA, Loewe D, Dieken H, Weidner T, Salzig D, Czermak P. Aeration and Shear Stress Are Critical Process Parameters for the Production of Oncolytic Measles Virus. Front Bioeng Biotechnol. 2019 Apr 17;7:78. doi: 10.3389/fbioe.2019.00078. PMID: 31058145; PMCID: PMC6478815.

245. Hupfeld, J., Heinrichs, K., Kraft, M., and Tappe, A. (2020). Comparison of primary T cells cultured in static conditions versus rocking motion bioreactors. Cytotherapy Cytotherapy (5, Supplement), S147. doi:10.1016/j.jcyt.2020. 03.298

246. Hydrodynamic Damage to Animal Cells. Yusuf Chisti. 2001. Critical Reviews in Biotechnology, 21(2):67–110.

247. Taïeb HM, Garske DS, Contzen J, Gossen M, Bertinetti L, Robinson T, Cipitria A. Osmotic pressure modulates single cell cycle dynamics inducing reversible growth arrest and reactivation of human metastatic cells. Sci Rep. 2021 Jun 29;11(1):13455. doi: 10.1038/s41598-021-92054-w. Erratum in: Sci Rep. 2021 Sep 24;11(1):19435. PMID: 34188099; PMCID: PMC8242012.

248. Kultz, D. and D. Chakravarty, 2001. Hyperosmolarity in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells. Proc. Nat. Acad. Sci., 98: 1999-2004.

249. Freshney, R.I., 1994. Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique. 3rd. Edn., Wiley-Liss, New York, pp: 83-84.

250. Tsao EI, Mason MR, Cacciuttolo MA, Bowen SH, Folena-Wasserman G. Production of parvovirus B19 vaccine in insect cells coinfected with double baculoviruses. Biotechnol Bioeng 1996;49:130–8.

251. Tapia, F., Vázquez-Ramírez, D., Genzel, Y., and Reichl, U. (2016). Bioreactors for high cell density and continuous multi-stage cultivations: Options for process intensification in cell culture-based viral vaccine production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100 (5), 2121–2132. doi:10.1007/s00253-015-7267-9

252. Frensing, T. (2015). Defective interfering viruses and their impact on vaccines and viral vectors. Biotechnol. J. 10 (5), 681–689. doi:10.1002/biot.201400429

253. keehan WM, Barnes D, Reid L, Stanbridge E, Murakami H, Sato G. Frontiers in mammalian cells culture. In Vitro Cell Dev Biol. 1990;26:9–23.

254. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. Reprod Med Biol. 2017 Mar 21;16(2):99-117. doi: 10.1002/rmb2.12024. PMID: 29259457; PMCID: PMC5661806.

255. Ringer S. Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. J Physiol. 1882;3:380–393. 5.

256. Ringer S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. J Physiol. 1883;4:29–42.

257. Harrison RG, Greenman MJ, Mall FP, Jackson CM. Observations of the living developing nerve fiber. Anat Rec. 1907;1:116–128.

258. Carrel A. Artificial activation of the growth in vitro of connective tissue. J Exp Med. 1913;17:14–19.

259. Ebeling AH. A ten year old strain of fibroblasts. J Exp Med. 1922;35:755–759.

260. XPS Characterization of the Surface Oxide Film of 316L Stainless Steel Samples that were Located in Quasi-Biological Environments. Takao Hanawa, Sachiko Hiromoto, Akiko Yamamoto, Daisuke Kuroda, Katsuhiko Asami. 2002. Materials Transactions, Vol. 43, No. 12 : pp. 3088 to 3092

261. Sato JD, Kan M. Media for culture of mammalian cells. Curr Protoc Cell Biol. 2001 May;Chapter 1:Unit 1.2. doi: 10.1002/0471143030.cb0102s00. PMID: 18228290.

262. Serum In Mammalian Cell Culture: Weighing The Challenges of Bioprocessing, Ethics and Animal Welfare, Yumi Zuhanis Has-Yun Hashim, Maizirwan Mel, Hamzah Mohd Salleh, Yusilawati Ahmad Nor, Siti Hajar Othman, Wan Yusra Hannanah Wan Abdul Razak. 2012. Advances in Natural and Applied Sciences, 6(5): 596-600, 2012 ISSN 1995-0772.

263. Hayashi I, Sato GH. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. Nature. 1976;259:132–134.

264. Levi-Montalcini R. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. Ann NY Acad Sci. 1952;55:330–344

265. Taylor JM, Mitchell WM, Cohen S. Epidermal growth factor: physical and chemical properties. J Biol Chem. 1972;247:5928–5934.

266. Gospodarowicz D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3t3 cell growth. Nature. 1974;249:123–127.

267. De Larco JE, Preston YA, Todaro GJ. Properties of a sarcoma-growthfactor-like peptide from cells transformed by a temperature-sensitive sarcoma virus. J Cell Physiol. 1981;109:143–152.

268. SEMURA, S.: ffhcr den Einflusz des Antuitrins und des Thyroxins auf das Wachvtum dc'r in vitro Kulturen von Fibroblasten, Arch. f. exper. Zellforsch. 10: 329, 1931.

269. A Feeding Solution for Cultures of Human Fibroblasts. Johannes P. M. Vogelaar and Eleanor Erlichman. 1933. American Journal of Cancer. Volume:18, pages: 28-38. url={https://api.semanticscholar.org/CorpusID:84629454.

270. D. K. Singh, A. Shukla, and S. Dixit, “Impact of phytohormones auxin and cytokinin on mammalian cells,” vol. 8, no. 2, pp. 7–12, 2018.

271. M. S. Vildanova, M. A. Savitskaya, G. E. Onishchenko, and E. A. Smirnova, “The Effect of Plant Hormones on the Components of the Secretory Pathway in Human Normal and Tumor Cells,” vol. 8, no. 5, pp. 407–415, 2014, doi: 10.1134/S1990519X14050095.

272. Varshovi, H.R., Norian, R., Azadmehr, A., Ahangaran, N.A., 2021. Immune response Characteristics of Capri Pox Virus Vaccines Following Emergency Vaccination of Cattle Against Lumpy Skin Disease Virus. https://doi.org/10.22067/veterinary. v9i2.65381.

273. Gari, G., Biteau-coroller, F., Legoff, C., 2008. Evaluation of Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) for the Diagnosis and Screening of Lumpy Skin Disease using Bayesian Method, vol. 129, pp. 269–280. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.005.

274. Chand, P., Kitching, R.P., Black, D.N., 1994. Western Blot Analysis of Virus-Specific Antibody Responses for Capripox and Contagious Pustular Dermatitis Viral Infections in Sheep, pp. 377–385.

275. Shankar, H., Yadav, M.P., 1988. Detection of Goat Pox Antigen and Antibody by the Counter Immunoelectrophoresis Test, pp. 109–113. Tuppurainen, E., 2017. Diagnostic Assays for the Detection of Lumpy Skin Disease Virus and Antibodies. no. October.

276. Jenson, T.A., 2014. Chapter 13 Agar Gel Immunodiffusion Assay to Detect Antibodies to Type A Infl uenza Virus, vol. 1161, pp. 141–150. https://doi.org/10.1007/978-1- 4939-0758-8

277. Haegeman, A., et al., Mar. 2020. An Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA) for the detection of lumpy skin disease antibodies. J. Virol. Methods 277, 113800. https:// doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113800

278. Tuppurainen, E., 2017. Diagnostic Assays for the Detection of Lumpy Skin Disease Virus and Antibodies. no. October.

279. Mahmoud, A., Khalafalla, A., Abdellatif, M., 2016. An epidemiological study of sheep and goat pox outbreaks in the Sudan. 2016. Food Biol. 5, 1–5. https://doi.org/ 10.19071/fbiol.2016.v5.3007.

280. Capstick, P.B., Coackley, W., 1961. Protection of cattle against lumpy skin disease. Res. Vet. Sci. 2, 362–368. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2008.01043.x.

281. Precausta, P., Kato, F., Vellut, G., 1979. A new freeze-dried living virus vaccine against sheep-pox. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 1, 305–319. Added

282. Sciences, P., et al., 2010. Production of Goat Pox Virus Vaccine From a Live Attenuated Goat Pox Virus Strain, 20, pp. 315–317.

283. Milovanovi, M., Dietze, K., Mili, V., Radoji, S., Val, M., Moritz, T., 2019. Humoral Immune Response to Repeated Lumpy Skin Disease Virus Vaccination and Performance of Serological Tests, pp. 1–9.

284. Bowden, T.R., Babiuk, S.L., Parkyn, G.R., Copps, J.S., Boyle, D.B., 2008. Capripoxvirus tissue tropism and shedding: a quantitative study in experimentally infected sheep and goats. Virology 371, 380–393

285. Embury-Hyatt, C., Babiuk, S., Manning, L., Ganske, S.; Bowden T.R.; Boyle D.B. and Copps J., 2012. Pathology and viral antigen distribution following experimental infection of sheep and goats with capripoxvirus. Journal of Comparative Pathology, (146), 106- 115.

286. ONSSA, http://www.onssa.gov.ma/fr/sante-animale/programme-de-prophylaxie/clavelee-ovine, dernier accès : 24/07/2023

287. Tuppurainen, E.S.M., Venter, E.H., Shisler J.L., Gari G., Mekonnen, G.A., Juleff, N., Lyons, N.A., De Clercq, K., Upton, C., Bowden, T.R., Babiuk, S., Babiuk, L.A., 2017b. Review: Capripoxvirus Diseases: Current Status and Opportunities for Control. Transboundary and Emerging Diseases 64, 729-745.

288. Venkatesan, G., Balamurugan, V., Singh, R.K., Bhanuprakash, V., 2010. Goat pox virus isolated from an outbreak at Akola, Maharashtra (India) phylogenetically related to H. Rhazi et al. Journal of Virological Methods 293 (2021) 114164 6 Chinese strain. Trop. Anim. Health Prod. 42, 1053–1056. https://doi.org/10.1007/ s11250-010-9564-8

289. Roy, P., Balakrishnan, S.J.S., Mahaprabhu, K.S.R., Maity, A.M.B., Karmakar, T.K.G.A.P., 2017. Molecular Epidemiology of Goat Pox Viruses, pp. 1–5. https://doi.org/ 10.1111/tbed.12763.

290. Enkhbaatar, B., Ariunbold, G., Erdenechimeg, D., Enkhmandakh, Yo., Munkhgerel, B., Usukhgerel, S., Boldbaatar, B., 2019. The result of propagation of sheep and goat pox viral vaccine strains into vero cells. Mong. J. Agric. Sci. 26, 3–9. https://doi.org/ 10.5564/mjas.v26i01.1190.

291. Getachew, G., Getnet, A., Gizawa, D., Wubetea, A., Kidanea, M., Asgedoma, H., Bayissa, B., Ayelet, G., Oura, Ch.A.L., Roger, F., Tuppurainen, E.S.M., 2015. Evaluation of the Safety, Immunogenicity and Efficacy of Three Capripoxvirus Vaccine Strains Against Lumpy Skin Disease Virus, 33, pp. 3256–3261. https://doi. org/10.1016/j.vaccine.2015.01.035.

292. LSD – National Veterinary Institute (nvi.com.et), consulted on 12/01/2021.

293. Babiuk, S., Parkyn, G., Copps, J., Larence, J.E., Sabara, M.I., Bowden, T.R., David, 2007. Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. J. Veterinary Diagnostic. 19, 486–491. https://doi.org/10.1177/ 104063870701900505

294. Faya, P.C., Cooka, Ch.G., Wijesiriwardanaa, N., Torea, G., Comtetc, L., Carpentierc, A., Shihb, B., Freimanisa, G., Hagaa, I.R., Beard, P., 2020. Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) Cells Are a Suitable Cell Line for the Propagation and Study of the Bovine Poxvirus Lumpy Skin Disease Virus, 285: 113943. https://doi.org/10.1016/j. jviromet.2020.113943.

295. Wallace, D.B., Viljoen, G.J., 2002. Importance of thymidine kinase activity for normal growth of lumpy skin disease virus (SA-Neethling). Arch. Virol. 147, 659–663. https://doi.org/10.1007/s007050200016.

296. Moller, ¨ J., Moritz, T., Schlottau, K., Krstevski, K., Hofmann, D., Beer, M., Hofmann, B., 2019. Experimental lumpy skin disease virus infection of cattle: comparison of a field strain and a vaccine strain. Arch. Virol. 164 https://doi.org/10.1007/s00705-019- 04411-w, 2931–294.

297. Munyanduki, H., Douglass, N., Offerman, K., Carulei, O., Williamson, A., 2020. Influence of the lumpy skin disease virus (LSDV) superoxide dismutase homologue on host transcriptional activity, apoptosis and histopathology. J. Gen. Virol. 101, 645–650. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001423.

298. Uzar, S., Sarac, F., Gulyaz, V., Enul, H., Yilmaz, H., Turan, N., 2020. Comparison and efficacy of two different sheep pox vaccines prepared from the Bakirkoy strain against Lumpy Skin Disease in cattle. Preprint.

299. ECACC General Cell Collection: MDBK, cat no 90050801.

300. ATCC: MDBK, cat no CCL-22.

301. Kengla, C., Kidiyoor, A., Murphy, V., S.V, 2017. Kidney Transplantation, Bioengineering and Regeneration. Kidney Transplantation in the Regenerative Medicine Era. Chapter Bioprinting Complex 3D Tissue and Organs, pp. 957–971. https://doi.org/ 10.1111/ajt.15599.

302. Identification and Molecular Characterization of Lumpy Skin Disease Virus in East Hararghe and East Shoa Zone, Oromia Regional State, Tassew, Asmelash, Assefa, Aster Gelaye, Essayas Bayisa, Berecha Ftiwi Mulugeta, Animal and Veterinary Sciences, Volume 4, pp: 1-16, 2018

303. Toloudi M, Ioannou E, Chatziioannou M, Apostolou P, Kiritsis C, Manta S, Komiotis D, Papasotiriou I. Comparison of the growth curves of cancer cells and cancer stem cells. Curr Stem Cell Res Ther. 2014 Mar;9(2):112-6. doi: 10.2174/1574888x0902140121163539. PMID: 24359142.

304. Seewöster T, Lehmann J. Cell size distribution as a parameter for the predetermination of exponential growth during repeated batch cultivation of CHO cells. Biotechnol Bioeng. 1997 Sep 5;55(5):793-7. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5<793::AID-BIT9>3.0.CO;2-6. PMID: 18636589.

305. Anju Verma, Megha Verma, Anchal Singh, Chapter 14 - Animal tissue culture principles and applications, Animal Biotechnology (Second Edition), Academic Press, 2020, Pages 269-293, ISBN 9780128117101, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4.35.

306. Wang G, Wang Y, Kong J, Li Y, Wu J, Chen Y, Liu X, Shang Y, Zhang Z. Comparison of the sensitivity of three cell cultures to ORFV. BMC Vet Res. 2019 Jan 7; 15(1):13. doi: 10.1186/s12917-018-1760-1. PMID: 30616567; PMCID: PMC6322270.

307. Hayflick l. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp Cell Res. 1965 Mar; 37:614-36. doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9. PMID: 14315085.

308. Jiang, Y., Zheng, W. (2019). Cell Damage and Transformation in Aging. In: Gu, D., Dupre, M. (eds) Encyclopedia of Gerontology and Population Aging. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69892-2_434-1

309. S. Gazzarrini and A. Y.-L. Tsai, "Hormone cross-talk during seed germination," *Essays Biochem.*, vol. 58, pp. 151–164, Sep. 2015, doi: 10.1042/bse0580151.

310. C. Won, S. K. Park, S. Cho, B. Min, and S. Roh, "Kinetin Enhances In Vitro Development of Parthenogenetic and Nuclear Transfer Porcine Embryos," vol. 1709, no. July 2007, pp. 1701–1709, 2008, doi: 10.1002/mrd.20920.

311. D. K. Singh, A. Shukla, and S. Dixit, "Impact of phytohormones auxin and cytokinin on mammalian cells," vol. 8, no. 2, pp. 7–12, 2018.

312. V. Cernaro *et al.*, "Auxin induces cell proliferation in an experimental model of mammalian renal tubular epithelial cells Auxin induces cell proliferation in an experimental model of mammalian renal tubular epithelial cells," no. February, 2015, doi: 10.3109/0886022X.2015.1015683.

313. N. Olszewski, T. Sun, and F. Gublerc, "and Signaling : Gibberellin Response Pathways," vol. 14, no. 2002, 2015.

314. T. Lange, "Review Molecular biology of gibberellin synthesis," no. May, 2014, doi: 10.1007/s004250050274.

315. Y. Kamiya and J. L. García-Martínez, "Regulation of gibberellin biosynthesis by light.," *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 2, no. 5, pp. 398–403, Oct. 1999, doi: 10.1016/s1369-5266(99)00012-6.

316. S. Yamaguchi, Y. Kamiya, and T. Sun, "Distinct cell-speci ® c expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during Arabidopsis seed germination," vol. 28, pp. 443–453, 2001.

317. M. Majda, "The Role of Auxin in Cell Wall Expansion," 2018, doi: 10.3390/ijms19040951.

318. C. Cookson, D. J. Osborne, C. Cookson, and D. J. Osborne, "Linked references are available on JSTOR for this article : Planta The Stimulation of Cell Extension by Ethylene and Auxin in Aquatic Plants," vol. 144, no. 1, pp. 39–47, 2016.

319. P. Achard *et al.*, "Report Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis," *Curr. Biol.*, vol. 19, no. 14, pp. 1188–1193, 2009, doi: 10.1016/j.cub.2009.05.059.

320. N. Gougoulias, "Effect of some phytohormones on polyphenols content and antioxidative activity of grape of mavrud variety (Vitis vinifera L .) Effect of Some Phytohormones on Polyphenols," no. January 2011, 2015.

321. N. Olszewski, T. Sun, and F. Gublerc, "and Signaling : Gibberellin Response Pathways," vol. 14, no. 2002, 2015.

322. Y. Kamiya and J. L. García-Martínez, "Regulation of gibberellin biosynthesis by light.," *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 2, no. 5, pp. 398–403, Oct. 1999, doi: 10.1016/s1369-5266(99)00012-6.

323. P. Hedden and A. L. Phillips, "Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes.," *Trends Plant Sci.*, vol. 5, no. 12, pp. 523–530, Dec. 2000, doi: 10.1016/s1360-1385(00)01790-8.

324. S. Yamaguchi, Y. Kamiya, and T. Sun, "Distinct cell-speci ® c expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during Arabidopsis seed germination," vol. 28, pp. 443–453, 2001.

325. M. Majda, "The Role of Auxin in Cell Wall Expansion," 2018, doi: 10.3390/ijms19040951.

326. R. A. C. Expansion, "HHS Public Access," no. 46, pp. 379–402, 2021, doi:10.1146/annurev-arplant-073019-025907.Rapid.

327. R. E. Cleland, "Evidence that Auxin-induced Growth of Soybean Hypocotyls Involves Proton Excretion1," vol. 66, no. 3, pp. 433–437, 2016.

328. J. T. Lowery and A. Arbor, "CELL WALL SYNTHESIS AND CELL ELONGATION IN OAT COLEOPTILE TISSUE !," vol. 49, no. 1934, pp. 342–347, 1961, doi: 10.1002/j.1537-2197.1962.tb15031.x.

329. E. M. Othman, M. Naseem, E. Awad, and T. Dandekar, "The Plant Hormone Cytokinin Confers Protection against Oxidative Stress in Mammalian Cells," pp. 1–14, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0168386.

330. Toriniwa H, Komiya T. Japanese encephalitis virus production in Vero cells with serum-free medium using a novel oscillating bioreactor. Biologicals. 2007;35(4):221–6

331. Yang J, Guertin P, Jia G, Lv Z, Yang H, Ju D. Large - scale microcarrier culture of HEK293T cells and Vero cells in single - use bioreactors. AMB Express. 2019. https://doi.org/10.1186/s13568-019-0794-5.

332. Lai C-C, Weng TC, Tseng YF, Chiang JR, Lee MS, Hu AYC. Evaluation of novel disposable bioreactors on pandemic influenza virus production. PLoS One. 2019;14(8):e0220803.

333. Chen XC, Liu H, Li H, Cheng Y, Yang L, Liu YF. In vitro expansion and differentiation of rat pancreatic duct-derived stem cells into insulin secreting cells using a dynamic three-dimensional cell culture system. Genet Mol Res. 2016;15(2).

334. Ho L, Greene CL, Schmidt AW, Huang LH. Cultivation of HEK 293 cell line and production of a member of the superfamily of G-protein coupled receptors for drug discovery applications using a highly efficient novel bioreactor. Cytotechnology. 2004;45(3):117–23

335. Babiuk, S., et al., 2009. Detection of Antibodies Against Capripoxviruses Using an Inactivated Sheeppox Virus ELISA, vol. 56, pp. 132–141. https://doi.org/10.1111/ j.1865-1682.2009.01067.x.

336. Bhanuprakash, V., Indrani, B.K., Hosamani, M., Singh, R.K., 2006. The Current Status of Sheep Pox Disease, vol. 29, pp. 27–60. https://doi.org/10.1016/j. cimid.2005.12.001.

337. Afayoa, M., et al., 2014. Comparison of Immunoperoxidase Monolayer Assay , Polymerase Chain Reaction and Haemadsorption Tests in the Detection of African Swine Fever Virus in Cell Cultures using Ugandan Isolates, vol. 6, pp. 36–45. https:// doi.org/10.5897/JGMV2014.0062 no. 4.

338. Gerber, P.F., Matos, A.C.D., Guedes, M.I.M.C., Madureira, M.C., Silva, M.X., Lobato, Z.I. P., 2012. Validation of an Immunoperoxidase Monolayer Assay for Total Anti – Vaccinia Virus Antibody Titration. https://doi.org/10.1177/1040638711435231.

339. Pileri, E., Cortey, M., Rodríguez, F., Sibila, M., Fraile, L., Segal´es, J., 2014. Comparison of the immunoperoxidase monolayer assay and three. Vet. J. 1, 3–6. https://doi.org/ 10.1016/j.tvjl.2014.05.025.

340. Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N., 1941. Experimental Biology and Medicine. https://doi.org/10.3181/00379727-47-13084P.

341. Cytochemistry, I., Cells, H., Dellavance, A., Eduardo, L., Andrade, C., 2019. Chapter 3, vol. 1901. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8949-2

342. Billiouw, M., Brandt, J., Vercruysse, J., Speybroeck, N., 2005. Evaluation of the Indirect Fluorescent Antibody Test as a Diagnostic Tool for East Coast Fever in Eastern Zambia, vol. 127, pp. 189–198. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.028.

343. Duarte, P.C., Daft, B.M., Conrad, P.A., Packham, A.E., Gardner, I.A., 2003. Comparison of a Serum Indirect Fluorescent Antibody Test with Two Western Blot Tests for the Diagnosis of Equine Protozoal Myeloencephalitis, vol. 13, pp. 8–13