

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE – ALGER

**PROJET DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE**

THEME

**L'optimisation des conditions de production du
vaccin anti-claveleux.**

Présenté par :

**Kirati Yasmine Chahinez
Matallah Djamila Abir**

Soutenu le : 01 Juillet 2012.

Le jury :

- **Président : Mr ZAOUANI** Maitre assistant classe B (ENSV).
- **Promoteur : Mlle BEN-MAHDI** Professeur (ENSV).
- **Examineur : Mr MADANI** chargé de recherche (IPA).
- **Examineur : Mr MOHAMMEDI** Maitre assistant classe A (ENSV).

Année universitaire : 2011/2012

Dédicace

Enfin le moment est arrivé pour dire un grand merci du fond du cœur à mes chers parents : je vous dédie, ce premier accomplissement qui sans vous ne serait pas concrétisé.

À mon cher frère Ikbal

À ma très chère sœur Romy

À ma grand-mère que dieu la bénisse.

À mes oncles, mes tantes et plus particulièrement Khalti Wassila qui est une deuxième mère pour moi.

À tous mes chers cousins et cousines.

Je dédie également ce travail à tous mes amis entre autres :

*Mimi (maymi) et Amira (mirou), Hama, Yasmine (jas), Katia (kakou),
Louiza (wiwi), Thirine (chichi), Sabrine (sabrou), Ahlem (helouma),
Uzayr, Narimen (narii), Amel....*

Je m'excuse auprès de ceux que j'ai oubliés de citer. Sachez que vous êtes tous dans mon cœur...

Matallah Djamila Abir

Dédicaces

A mes très chers parents.

Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte.

Je mets entre vos mains, le fruit de longues années d'études. Chaque ligne de ce manuscrit, chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être mes parents.

A ma sœur Asma.

A mes frères Mohamed Yacine et Abderrahmane.

Veuillez trouver dans ce travail un modeste témoignage de mon admiration et toute ma gratitude, de mon affection la plus sincère et de mon attachement le plus profond.

A mes Grand-mères, tantes, oncles, cousines et cousins et l'ensemble de la famille.

En témoignage de gratitude et d'attachement.

*A mes amis Abir, Katia, Sabrina, Chirine, Louiza, Ahlem,
Narimene, Ozayr et Amel.*

*Vous m'avez toujours soutenu et vous continuez à le
faire. Je vous considère comme de la famille je ne trouverai
les mots pour vous exprimer mon affection et mon estime. Je
vous souhaite tous bonheur, santé et prospérité.*

*A tous mes camarades de l'ENSV et futurs collègues
Merci pour ces cinq années.*

Kirati Yasmine Chahinez.



Merci

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Allah le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

La première personne que nous tenons à remercier chaleureusement est notre professeur encadrant, le Pr.Benmehdi pour l'orientation, la confiance et la patience qu'elle nous a prodigué et qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené à bon port. Qu'elle trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Nos remerciements s'étendent également au Dr.Madani de l'Institut Pasteur d'Algérie pour ses bonnes explications et sa collaboration avec nous dans l'accomplissement de ce modeste travail.

Nous exprimons notre gratitude à l'ensemble de l'équipe du laboratoire de production des vaccins viraux vétérinaires de l'Institut Pasteur d'Algérie qui ont accepté de répondre à toutes nos questions avec gentillesse.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci 

SOMMAIRE

Introduction

Partie bibliographique

I.ETUDE CLINIQUE DE LA CLAVELEE	1
I.1. Définition.....	1
I.2. Symptomatologie.....	1
I.2.1.La forme classique.....	1
a. La forme classique vésiculeuse.....	1
b. La forme classique nodulaire	4
I.2.2. Les formes compliquées.....	4
I.3. Lésions.....	5
I.3.1. Lésions macroscopiques.....	5
I.3.2. Lésions microscopiques.....	5
I.4. Diagnostic :.....	6
I.4.1. Diagnostic clinique.....	6
I.4.2. Diagnostic différentiel	7
I.4.3.Diagnostic expérimental.....	7
a. Prélèvements.....	7
b. Isolement et identification du virus.....	7
I.5.Prophylaxie	8
I.5.1.Prophylaxie sanitaire	8
I.5.2.Prophylaxie médicale	9
II. ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA CLAVELEE	10
II.1. Importance.....	10
II.2.Espèces affectées.....	10
II.3.Répartition géographique de la maladie.....	10
II.4. Agent pathogène.....	13

II.4.1. Morphologie et structure du virus.....	13
II.4.2. Propriétés physico-chimiques.....	14
II.4.3. Propriétés biologiques.....	14
4.3.1. Culture <i>in vivo</i>	14
4.3.2. Culture <i>in ovo</i>	14
4.3.3. Culture <i>in vitro</i>	14
II.4 4. Pouvoir immunogène et antigène.....	15
II.5.Les matières virulentes.....	15
II.6. Réceptivité des animaux	15
II.7.Source et transmission de l'infection.....	16
CHAPITRE II : VACCINS ET VACCINATION ANTI-CLAVELEUSE	
II.1. Définition et principe de la vaccination.....	17
II.2. Composition d'un vaccin.....	17
II.2.1. Antigènes vaccinaux.....	17
II.2.2. Adjuvants.....	17
II.2.3. Résidus du processus de fabrication.....	18
II.2.4. Les conservateurs.....	18
II.2.5. Les contaminants.....	18
II.3.Effets indésirables et risques liés à l'utilisation des vaccins.....	18
II.4.Les types de vaccins.....	19
II.4.1. Vaccins issus d'agents infectieux inactivés.....	19
II.4.2. Vaccins issus d'agents vivants atténués.....	19
II.4.3. Vaccins synthétiques.....	19
II.4.4. Vaccins constitués de toxines inactivées.....	20
II.5.Préparation des vaccins.....	20
II.5.1.Objectifs	20
II.5.2 Pré-requis essentiels.....	20

II.5.3.Etapes de la fabrication	20
a. Obtention de la souche.....	20
b. obtention du vaccin.....	21
c. formulation des vaccins.....	21
d. contrôles.....	21
e. conservation.....	22
f. étiquetage.....	22
II.6. Principaux vaccins anti-claveleux anciennement utilisés.....	22
II.7. vaccins anti-claveleux produits en Algérie.....	25
II.8.Le procédé actuellement utilisé en Algérie.....	26
II.9. Principe de la culture cellulaire.....	28
II.9.1.Les techniques d'obtention des cellules.....	29
a. La méthode par dissection.....	29
b. La méthode par digestion enzymatique.....	30
III. Partie expérimentale	
I. Objectif.....	31
II. Matériels & Méthodes.....	31
II.1. Matériels.....	31
II.1. 1. Matériels non biologiques.....	31
II.1. 2. Matériels biologiques.....	31
II.1. 2. A. Souche vaccinale.....	32
II.1. 2. B. Milieux de culture (Milieux nutritifs)	32
II.1. 2. C. Solutions et réactifs.....	32
II.2. Méthodes.....	33
II.2.1. La production de cellules rénales.....	33
II.2.1.A. Extraction du fœtus.....	33
II.2.1.B. Isolement (Trypsination du cortex rénal)	35

II.2.1.C. Mise en culture des cellules RM (Cellules rénales d'agneau fœtal).....	35
II.2.1.D. Trypsination des cellules rénales de 1 ^{er} explant.....	37
II.2.2. La production de la culture virale.....	39
II.2.2.A. Culture virale du virus de la clavelée sur cellules de rein d'agneau fœtal (RM).....	39
II.2.2.B. Récolte et titrage de la culture virale.....	40
II.2.3. La préparation du vaccin en vrac (Bulk viral).....	41
II.2.4. La répartition et la lyophilisation.....	41
II.2.4. A. La congélation.....	41
II.2.4.B. La dessiccation primaire ou sublimation.....	41
II.2.4.C. La dessiccation secondaire ou séchage final.....	42
III. Le contrôle du vaccin.....	42
III.1. Contrôles en cours de fabrication.....	42
III.1.1. Souche vaccinale.....	42
III.1.2. Contrôle des cellules.....	42
III.1.3. Contrôle de stérilité des milieux utilisés pour la culture cellulaire.....	42
III.1.4. Contrôle de stérilité des récoltes virales.....	43
III.2. Les contrôles du produit fini.....	43
IV.Résultats et discussion.....	45
Conclusion	

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : Degré Celsius.

µm : Micromètre

ADN : Acide Désoxyribonucléique

CM : Centimètre

CO₂ : Dioxyde de Carbone.

DICT : Dose Infectante en Culture Tissulaire

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DSV : Direction des Services Vétérinaires

ECP : Effet Cytopathogène.

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

FAO: Food Agriculture Organization

G: Gramme

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

IPA : Institut Pasteur d'Algérie

L : litre

ml : Millilitre

MIN: Minute

mm: Millimètre

nm : Nanomètre

OIE : Office International des Epizooties

PBS: Phosphate Buffered Saline

pH: potential d'Hydrogène

RM : Rein de Mouton

SVF : Le sérum de veau fœtal

UPMC : Université de Pierre et de Marie Curie

UV : Ultra-violet

VACC : Vaccin

Liste des figures

Figure 1: Blépharo-conjonctivite et lésions croûteuses sur la paupière.....	2
Figure 2: Papules chez un mouton à laine rasée.....	3
Figure 3: Lésions papulo-vésiculeuses sur la tête et l'encolure au stade de la dessiccation.....	4
Figure 4: Répartition géographique de la clavelée et de la variole caprine en 2003.....	11
Figure 5: Répartition des foyers de clavelée en Algérie en 2011.....	12
Figure 6 : Représentation schématique de la structure d'un Poxvirus.	13
Figure 7 : Notice du « clavax ».	27
Figure 8 : Extraction du fœtus.....	34
Figure 9 : Extraction des reins.....	35
Figure 10 : boîtes de culture.....	36
Figure 11 : incubation des boîtes de culture.....	37
Figure 12 : cellules rénales trypsinées en suspension observées sous microscope optique inversé.....	38
Figure 13 : l'effet cytopathogène (ECP) observé sous microscope optique inversé.....	40

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Fréquences des lésions de clavelée selon les organes atteints chez les ovins...6

Tableau II : Nombre de foyers de clavelée en Algérie (2004-2010).....12

Tableau III : Effectif des ovins vaccinés contre la clavelée (2004-2011).....28

Introduction

La clavelée et la variole caprine sont des maladies virales affectant les ovins et les caprins. Elles se caractérisent par une hyperthermie, une éruption généralisée de papules ou de nodules, rarement des vésicules ou des lésions internes sont constatées (particulièrement au niveau des poumons), et peuvent se terminer par la mort.

En 1578, Joubert et Rabelais en font la description pour la première fois dans la région de Montpellier sous le nom de « *picotte* ».

La clavelée aussi connue sous le nom de variole ovine, est une maladie qui revêt une importance de plus en plus grande notamment en Afrique et dans les pays du Moyen Orient où l'élevage ovin, principalement de type extensif contribue pour une part importante dans la production de viandes rouges.

Cette maladie a pour particularité de diffuser rapidement dans un pays ou dans une région, ou entre différents pays, à l'occasion de mouvements d'ovins infectés, notamment au cours des saisons où la promiscuité entre ovins est importante.

La clavelée par son incidence économique, constitue encore pour certains pays à élevage ovin, un problème préoccupant. C'est une maladie dont le diagnostic est aisé, qui est spécifique des ovins et contre laquelle on dispose actuellement de vaccins d'efficacité et d'innocuité reconnues qui confèrent une durée d'immunité d'au moins une année (**FAO, 2000**).

La clavelisation, à l'image de la variolisation chez l'homme, a été largement pratiquée au XVIII^e siècle dans les pays d'enzootie et cette pratique contribuait, semble-t-il, à réduire les pertes en conférant une protection consécutive à une forme clinique bénigne de la maladie.

En 1902, Borrel démontre la nature virale de l'agent causal et décrit les inclusions cytoplasmiques désignées sous le nom de corpuscules de Borrel (**FASSI-FEHRI et LEFEVRE, 2003**).

En 1935, Bridré réussit la culture du virus sur fragments de testicules de mouton. Dès lors les tentatives pour mettre au point des vaccins se sont multipliées, mais il faudra attendre les années cinquante, pour que la multiplication du virus soit obtenue en culture cellulaire.

En Algérie, cette maladie représente la dominante pathologique la plus importante de l'élevage ovin. Afin d'en juguler les effets, l'État a recours à la vaccination annuelle. Celle-ci se déroule sous la forme de campagnes nationales de prophylaxie et utilise un vaccin à virus modifié produit sur culture cellulaire au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) à partir de la souche virale RM65, d'origine Yougoslave, qui a été adaptée et atténuée par 30 passages successifs sur cellules rénales d'agneaux.

Le présent travail, a eu par conséquent comme principal objectif, d'étudier les différentes phases de production du vaccin claveleux: Clavax ®, produit par l'IPA et d'identifier les points critiques de sa production et de son optimisation.

Pour ce faire, notre manuscrit a été articulé en deux parties :

- Une première partie bibliographique, consacrée à une mise au point bibliographique sur la clavelée et la prévention vaccinale de celle-ci.
- Une seconde partie expérimentale sur les différentes étapes de production du Clavax ® et des possibilités de son optimisation.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LA CLAVELEE

I. ETUDE CLINIQUE DE LA CLAVELEE

I.1. Définition

La clavelée ou variole ovine est une maladie infectieuse virale, hautement contagieuse, virulente, inoculable, spécifique des ovins (**FAO, 2000**).

Elle est inscrite sur la liste A de l'ancienne classification des maladies notifiables à l'OIE et figure parmi les « Maladies des ovins et des caprins » dans la nouvelle classification de l'OIE

(**OIE, 2012**).

Elle est due à un virus de la famille des *Poxviridae*, du Genre *Capripoxvirus*. Cliniquement, la clavelée se traduit par de l'hyperthermie et l'apparition au niveau de la peau et des muqueuses d'éruptions papulo-vésiculeuses ou nodulaires, évoluant vers la mort ou la convalescence avec des cicatrices cutanées indélébiles. La clavelée est considérée comme la plus contagieuse et la plus meurtrière des varioles animales (**FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003**).

La clavelée ou variole ovine est également connue sous plusieurs appellations à savoir :

Sheep Pox (en anglais), *viruela ovine* (en espagnol), *vaiolo ovino* (en italien), et *jedri* (en arabe) (**FAO, 2000**).

I.2. Symptomatologie

Après une incubation de 7 à 14 jours (extrêmes de 4 jours à 3 semaines), la maladie évolue soit sous sa forme classique (vésiculeuse ou nodulaire), soit sous une forme compliquée.

I.2.1. La forme classique

a. La forme classique vésiculeuse : Comporte quatre phases

- *La phase d'invasion* : de 2 à 4 jours, se traduit par de l'hyperthermie (40 à 41,5°C), de l'abattement, de la tristesse, une perte d'appétit, des tremblements, une polypnée, ainsi qu'une rhinite et une conjonctivite, avec un jetage nasal et oculaire abondant. Certains animaux présentent une blépharo-conjonctivite et une photophobie.

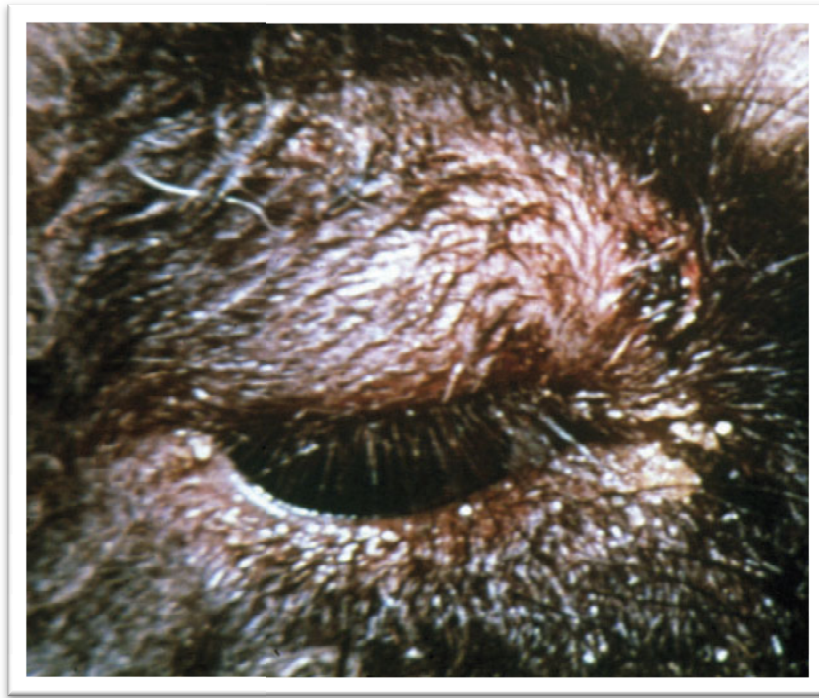


Figure1 : Blépharo-conjonctivite et lésions croûteuses sur la paupière (**CHANTAL, 2006**).

- *La phase d'éruption* de 3 à 4 jours se manifeste par l'apparition au niveau des zones glabres du prépuce, du périnée, de la vulve, des oreilles, sous la queue, sous l'aîne et sur la face (lèvres, narines, joues, paupières) de taches roses ou rouges qui s'étendent rapidement, et se transforment en papules rondes ou ovalaires de 6 à 20 mm de diamètre. Elles peuvent être proéminentes ou s'étendre en placards peu saillants. l'éruption peut se généraliser à tout le corps. pendant cette phase, la température revient à la normale (**FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003**).



Figure 2 : Papules chez un mouton à laine rasée (*CHANTAL, 2006*).

- *La phase de sécrétion* ou papulo-vésiculaire se caractérise par l'affaissement des papules et leur infiltration par un liquide jaune-rougeâtre qui les transforme en vésicules. La laine, à ce moment, s'arrache facilement. La formation de ces vésicules n'est pas toujours observée et on note, à sa place, l'exsudation d'un sérum qui coagule à la surface des papules.

- *La phase de dessiccation* : de 4 à 5 jours, se traduit par la dessiccation des pustules (ou de l'exsudat) et la formation de croûtes jaunâtres, dense, arrondies, rappelant des têtes de clous incrustées dans la peau, d'où le nom de (claveau) (du latin *clavus*, qui signifie clou). ces croûtes se détachent et font place à des processus cicatriciels qui laissent des traces indélébiles.



Figure 3 : Lésions papulo-vésiculeuses sur la tête et l'encolure au stade de la dessiccation (*CHANTAL, 2006*).

b. La forme classique nodulaire

En Afrique sub-saharienne et en Inde, une forme dite nodulaire ou « avortée » (Stone pox des auteurs anglo-saxons) est fréquente, voire unique : les papules évoluent en nodules plus ou moins volumineux, qui se nécrosent et tombent en laissant un tissu cicatriciel glabre. Cette forme rappelle la dermatose nodulaire des bovins.

I.2.2. Les formes compliquées

Se traduisent par des difficultés respiratoires profondes, accompagnées de jetage abondant et sanguinolent, des troubles digestifs avec une diarrhée hémorragique ; des symptômes nerveux sont observés parfois.

Des complications bactériennes peuvent survenir (notamment par *Pasteurella*).

Par ailleurs, bien que rarement signalées, des formes suraigües ou septicémiques existent qui se traduisent par une mortalité élevée avant apparition des lésions cutanées. Seuls les symptômes généraux sont visibles (*FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003*).

I.3. Lésions

I.3.1. Lésions macroscopiques

On distingue des lésions accessoires se traduisant par des phénomènes congestifs et hémorragiques sur le tractus digestif et des lésions essentielles représentées par la pustule clavelleuse, les nodules sous-cutanés, et l'atteinte pulmonaire (**BELKASSEM, 1977**).

Le tractus respiratoire est presque toujours le siège de nodules, alors que ceux-ci sont moins fréquents dans les muqueuses du tractus digestif, l'utérus ou les reins (**FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003**).

Au début de l'évolution on note des ecchymoses en petites masses sous la plèvre. Puis ces ecchymoses se transforment en petites masses grisâtres enchâssées dans le parenchyme pulmonaire. Et, au dernier stade, Il s'agit de nodules fermes, hyalins, blanchâtres, caséux de formes pyramidales dont la pointe est enchâssée dans le parenchyme pulmonaire ou les muqueuses (**BLEKASSEM, 1977**).

Il convient de signaler que certains symptômes comme l'inrumination ou l'avortement dépendent de la localisation de ces nodules (et de leur nombre) dans les différents organes (**FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003**).

I.3.2. Lésions microscopiques

Au stade initial de la macule, on note une réaction inflammatoire congestive, avec infiltration œdémateuse du derme. Progressivement, ces taches ecchymotiques se transforment en pustules par envahissement par des cellules histiocytaires de grande taille, à cytoplasme basophile, à noyau ovalaire ou irrégulier. La réaction inflammatoire et l'œdème deviennent importants au niveau du derme. Des lésions de nécrose et de thrombose veineuse s'installent dans le derme. Au niveau de l'épiderme, on observe de l'acanthose évoluant vers la para- et l'hyperkératose. Les papules nécrotiques, bien délimitées, se dessèchent. Les croûtes formées par l'exsudat desséché et l'épiderme nécrotique recouvrent un tissu cicatriciel dépigmenté (**FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003**).

Des lésions nodulaires inflammatoires s'observent au niveau du parenchyme pulmonaire et des premières voies respiratoires, parfois au niveau de la caillette.

L'élément typique de la lésion clavelleuse est la présence de cellules de grande taille, à noyau vacuolé, à chromatine marginée, renfermant des inclusions cytoplasmique arrondies ou irrégulières.

Ces inclusions sont identiques à celles observées en cultures cellulaire (*FASSI-FEHRI et LEFEVRE, 2003*).

Tableau I : Fréquences des lésions de clavelée selon les organes atteints chez les ovins.

ORGANES	POURCENTAGE
Peau	100
Poumon	90.8
Larynx-Pharynx	90.8
Trachée	79
Langue	71
Caillette	31.5
Reins	26
Rumen	25
Réseau	17
Œsophage	9
Foie	6.6
Feuillet	1
Utérus	1

(*MURTY et SINGH, 1971*).

I.4. Diagnostic :

Le diagnostic de la variole ovine s'appuie sur les signes cliniques susmentionnés. Il faut cependant effectuer des épreuves en laboratoire pour isoler et identifier le virus afin de confirmer le diagnostic.

I.4.1. Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique de la variole ovine est aisé. L'hyperthermie, les éruptions cutanées érythémateuses, papuleuses, pustuleuses ou nodulaire visibles dans la zone glabre (périnée, vulve, scrotum, sous la queue, autour des lèvres et des paupières), sont caractéristiques de la maladie.

L'allure épizootique de cette dernière vient confirmer le diagnostic clinique.

Du point de vue anatomopathologique les lésions congestivo-hémorragiques, les pustules et les papules, à localisation cutanée, trachéale ou pulmonaire sont très significatives (*FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003*).

I.4.2. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel doit se faire avec :

- Eczéma du mouton, qui se différencie par l'absence de pustules et l'absence de fièvre.
- Gale sarcoptique ou noir museau, qui évolue sans atteinte générale, avec des croûtes sans formation de papules.
- Ecthyma contagieux qui se manifeste par des lésions vésiculeuses exsudatives croûteuses localisées au niveau des lèvres, de la gencive chez l'agneau, au niveau de la mamelle chez la brebis.
- Peste des ruminants, se distingue par les érosions ulcératives des muqueuses linguales et buccale ainsi que par les lésions de l'appareil respiratoire.
- La fièvre aphteuse, peut prêter à confusion au début, mais l'apparition des boiteries associées à la présence de vésicules sur les pieds, la bouche et la mamelle, supprime cette confusion.
- Acné : inflammation localisée des glandes sébacées, ce sont des pustules cutanées indolores, diversement localisées, apparaissant, après la tonte, sans atteinte de l'état général, sans atteinte de l'état général (**BELKASSEM, 1977**).

I.4.3. Diagnostic expérimental

Le recours au diagnostic biologique est nécessaire quand la maladie est suspectée pour la première fois dans une zone indemne.

a. Prélèvements

Les papules ou les nodules cutanés, ainsi que les nodules rencontrés sur les organes internes sont les prélèvements de choix, mais ils doivent être effectués au cours des 10 premiers jours avant l'apparition des anticorps neutralisants. La fraction leucocytaire du sang recolté sur héparine peut aussi être utilisée, à condition qu'elle soit prélevée aux tous premiers stades de la maladie (avant ou au tout début de la généralisation des lésions cutanées) (**OIE, 2005**).

b. Isolement et identification du virus

Après broyage dans une solution saline tamponnée (PBS) additionnée d'antibiotiques, clarification par centrifugeuses à 3000 tours pendant 15 minutes et filtration sur filtre de 0.45µm, on inocule des cultures de cellules rénales ou testiculaires d'agneau. L'effet cytopathogène, qui devient très net après 2 ou 3 passages et les inclusions intracytoplasmiques sont caractéristiques du virus.

L'immunofluorescence et l'inhibition de l'effet cytopathogène par un antisérum spécifique permettent de compléter l'identification du virus. La détection de l'antigène par le test ELISA peut être utile (*OIE, 2005*).

Si un diagnostic d'urgence s'impose, il est possible à partir du broyat d'origine de pratiquer un examen au microscope électronique. Bien que l'aspect des *capripoxvirus* soit identique à celui des *orthopoxvirus*, cet examen permet de porter un diagnostic car seuls les *capripoxvirus* provoquent des lésions chez les petits ruminants (*OIE, 2005*).

Les tests sérologiques, notamment l'immunodiffusion en gélose et l'immunofluorescence indirecte, sont intéressants pour le diagnostic rapide de masse. La neutralisation virale en culture cellulaire est utile pour la caractérisation précise de la souche virale (*OIE, 2005*).

I.5. Prophylaxie

Bien que la clavelée soit connue par les éleveurs depuis les temps les plus reculés, ce n'est que depuis environ une trentaine d'années que des moyens de lutte efficaces ont été mis au point contre cette maladie.

I.5.1. Prophylaxie sanitaire :

Les stratégies en matière de prophylaxie sanitaire varient selon la situation de chaque pays.

Dans les zones indemnes, les mesures consistent à contrôler les importations d'animaux, des produits d'animaux (cuirs, peaux, laine et poils) et la semence des béliers en provenance de régions infectées. Par ailleurs, si le pays indemne est limitrophe d'un pays contaminé, la surveillance aux frontières doit être renforcée. Tout échange implique la mise en quarantaine des animaux nouvellement introduits pendant au moins 15 jours et la désinfection de la laine et des peaux par des produits actifs (*FAO, 2000*).

Dans les zones infectées, le but est de limiter la propagation de la maladie par identification, isolement et séquestration des animaux malades et des foyers contaminés (interdire le mouvement des animaux malades pendant 45 jours). Destruction des cadavres et désinfection des lieux (*FAO, 2000*).

Ces mesures sont en fait difficiles à appliquer dans les pays où la maladie est fortement implantée, car le portage se perpétue par le mouvement des troupeaux (nomadisme, transhumance).

I.5.2. Prophylaxie médicale

Dans les pays où la maladie est enzootique, la prophylaxie médicale par vaccination, complétée par les mesures de prophylaxie sanitaire précédemment citées, constitue le moyen de lutte le plus réaliste.

En Algérie, la lutte contre la clavelée repose sur la prophylaxie médicale, chaque année une campagne de vaccination, des ovins âgés de plus de 3 mois est réalisée, durant la période allant du mois de mars au mois de juin.

II. ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA CLAVELEE

II.1. Importance

La clavelée est une maladie particulièrement importante sur le plan économique dans les pays où elle est enzootique. La variole ovine provoque des pertes considérables en agneaux, en peaux, en laine, en viande et en lait.

La morbidité atteint rapidement 100%, avec une mortalité qui reste faible dans les formes bénignes (de 5 à 20 % selon les auteurs), et qui peut avoisiner les 80 % chez les agneaux et dans les formes sévères, surtout en zone non-endémique ou si d'autres affections concomitantes existent (peste des petits ruminants par exemple). Les formes les plus sévères sont rencontrées chez de jeunes animaux **(BOOS, 2009)**.

Même en cas de guérison, les éleveurs subissent des pertes liées à une baisse sensible des productions (laine, lait), à une diminution de la capacité de production de viande, aux avortements et aux mammites **(FAO, 2000)**.

II.2.Espèces affectées

Le virus de la clavelée est considérée comme spécifique du mouton, tant dans les conditions naturelles qu'expérimentales. Les caprins sont réfractaires.

Aucun animal de laboratoire n'est réceptif.

II.3.Répartition géographique de la maladie

D'après les données de l'OIE, la clavelée est la variole caprine présentent à peu près la même aire d'extension. On distingue :

- Les pays où la clavelée n'a jamais été signalée (pays du continent Américain et de l'Océanie). Il est en est de même pour certains pays d'Afrique (Afrique du Sud, Angola, Zambie, Zimbabwe) et Madagascar.
- Les pays devenus indemnes : ce sont la plupart des pays d'Europe qui ont réalisé l'éradication de la maladie entre 1850 (Irlande) et 1960 (France) **(FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003)**.

La clavelée est répandue dans les régions du monde où l'élevage des petits ruminants est de type extensif.

En effet, une trentaine de pays sont infectés : ils se trouvent en Afrique du Nord, Moyen Orient, Asie Centrale et certaines régions de chine (*FAO, 2000*).

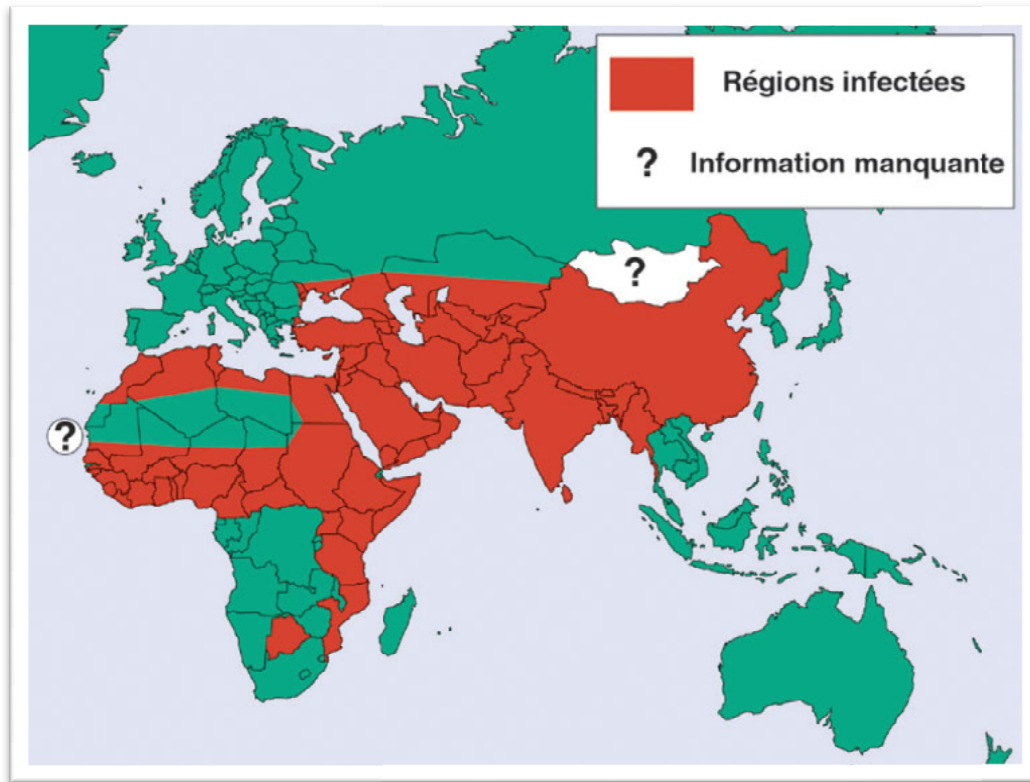


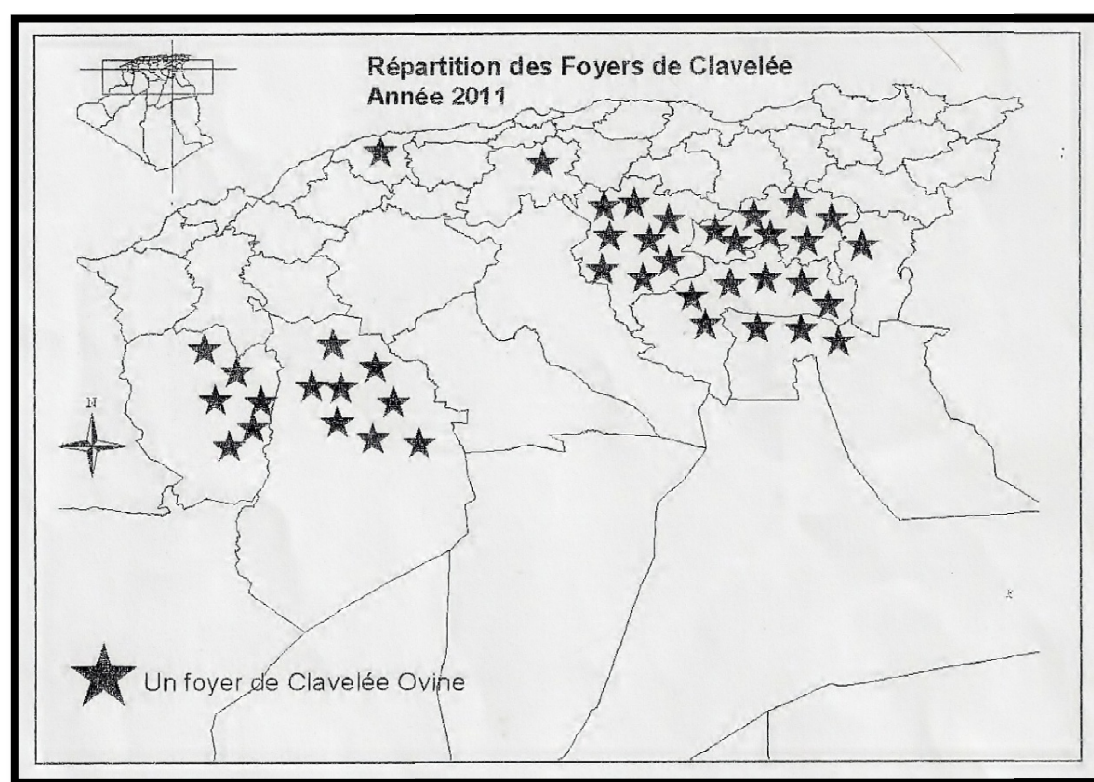
Figure 4 : Répartition géographique de la clavelée et de la variole caprine en 2003
(Adapté de LEFEVRE, 2003).

La clavelée suit une évolution enzootique dans notre pays, En effet, un pic à été constaté en 2008 où le nombre de foyer est passé de 221 en 2007 à 618 en 2008. Puis le nombre de foyers a commencé à régresser à partir de l'année 2009 (*DSV, 2010*).

Tableau II : Nombre de foyers de clavelée en Algérie (2004-2010).

Année	Nombre de foyers	Nombre de foyers confirmés par laboratoire
2004	37	23
2005	9	7
2006	5	0
2007	221	13
2008	618	61
2009	162	57
2010	108	37

(DSV, 2010)

**Figure 5 : Répartition des foyers de clavelée en Algérie en 2011 (DSV, 2011).**

II.4. Agent pathogène

II.4.1. Morphologie et structure du virus

Le virus de la clavelée appartient à la famille des *Poxviridae*, sous-famille des *Chordopoxvirinae*, genre *Capripoxvirus* dont le virus de la clavelée est l'espèce-type (**FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003**).

La particule virale du virus de la clavelée, présente une forme de brique de 00 x 270 x 200 nm (**Figure 2**). Elle est recouverte d'une enveloppe externe à double couche, formée de structures lipoprotéiques renfermant deux corps latéraux lenticulaires, dont les fonctions sont inconnues, situés de part et d'autre du core virale biconcave représentant la nucléocapside (**FASSI-FEHRI et LEFEVRE, 2003**).

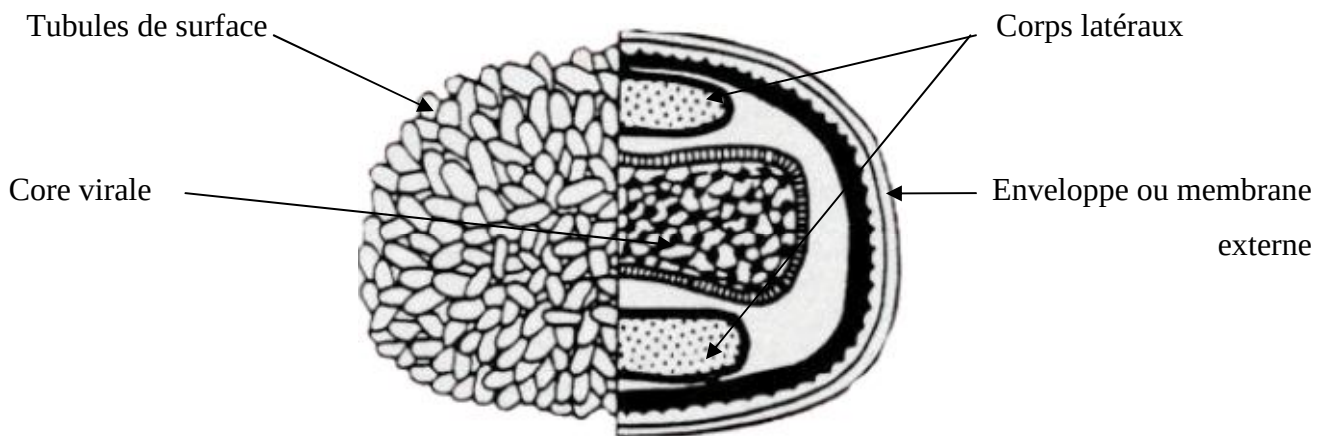


Figure 6 : Représentation schématique de la structure d'un Poxvirus (BERTAGNOLI, 2003).

C'est un virus à symétrie complexe, à ADN bicaténaire linéaire constitué de 150 à 160 000 paires de bases (pb).

L'analyse génomique des fragments de restriction et les études immunologiques montrent que les *Capripoxvirus* constituent un groupe homogène de virus. Le gène thymidine kinase (TK) a été identifié chez tous les virus de ce genre. (**FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003**).

II.4.2. Propriétés physico-chimiques

Le virus de la clavelée est sensible à la chaleur (2 heures à 56 °C 30 min à 65 °C) et à la lumière solaire. Toutefois, il est très résistant à la dessiccation d'où son infectiosité qui persiste plusieurs mois dans les croûtes varioliques. Il peut également résister dans la laine pendant 2 mois et dans les locaux pendant 6 mois (**FAO, 2000**).

Vis-à-vis des agents chimiques, le virus est sensible à l'éther (20 %), au chloroforme et au formol (1%). Il est inactivé en 15 min par le phénol (2 %) et sensible à des détergents tels que dodécylsulfate de sodium (SDS) (**FAO, 2000**).

II.4.3. Propriétés biologiques

4.3.1. Culture *in vivo*

Par inoculation intradermique au mouton, Borrel a obtenu une pustule riche en virus appelée « pustule géante de Borrel ». Cette méthode a été largement utilisée comme source de virus pour la préparation des vaccins. Cependant, le rendement en virus varie avec les souches, le nombre de passage et les races de mouton (**FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003**).

4.3.2. Culture *in ovo*

Le virus claveleux peut se cultiver sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œufs embryonnés. En 1957, SABBAN avait montré que la multiplication du virus sur cette membrane exige des passages alternés sur mouton et embryon de poulet (**BELKASSEM, 1977**).

4.3.3. Culture *in vitro*

Le virus de la clavelée s'adapte à la culture sur cellules d'explants primaires, aussi bien de cellules homologues testiculaires, rénales, thyroïdiennes, pulmonaires, cardiaques, cutanées, musculaires, que sur cellules hétérologues de caprins, de bovins et de volaille.

L'effet cytopathogène (ECP) sur cellules testiculaires et rénales d'agneau se manifeste en 2 à 4 jours par l'apparition de foyers de cellules arrondies et réfringentes à cytoplasme granulaire et noyau fragmenté (**FASSI-FEHRI et LEFEVRE, 2003**).

II.4 4.Pouvoir immunogène et antigène

Les virus des varioles ovines et caprines présentent une remarquable stabilité antigénique et on ne leur reconnaît qu'un seul type antigénique (**FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003**).

Le virus claveleux provoque l'apparition d'anticorps neutralisants et d'anticorps fixant le complément. Il possède également un pouvoir immunigène car les moutons claveleux restent immunisés pendant plusieurs années (**BELKESSAM, 1977**).

II.5.Les matières virulentes

Sont constituées principalement par :

- Les sécrétions nasales et salivaires
- Les exsudats des papules et des croûtes desséchées, riches en virus et à l'origine d'aérosols infectieux.
- Les matières fécales.

La maladie évolue plus rapidement lorsqu'il ya un régime alimentaire défaillant, un manque d'abri, ou lors de survenue d'intempéries, en plus des maladies intercurrentes (parasitaires...) favorisant l'extériorisation des symptômes.

II.6. Réceptivité des animaux

La réceptivité des animaux à la clavelée est conditionnée par des facteurs propres à l'animal et aux spécificités de l'élevage pastoral qui est un élevage pastoral et transhumant (**BELKESSAM, 1977**).

Des études ont mis en évidence certaines spécificités épidémiologiques de la clavelée ovine : les femelles seraient plus atteintes que les mâles (**MURTY et SINGH, 1971**), les races à laine (mérinos) seraient plus sensibles que les races à poils et que les jeunes, entre 2 et 18 mois, présenteraient les formes les plus sévères (**FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003**).

La clavelée sévit sur tout « le pays du mouton » à l'état endémique. Lorsque les moutons sont en bon état d'entretien, elle reste souvent discrète ou bénigne et ne présente aucune gravité. Mais, lorsque les animaux sont affaiblis par les maladies parasitaires, par la disette et le froid, la maladie s'éveille et prend des allures épizootiques. Les flambées de clavelée sont des révélateurs de la misère physiologique des animaux (**BELKESSAM, 1977**).

II.7.Source et transmission de l'infection

- La transmission spontanée de la maladie se fait essentiellement par contact direct, par inhalation de matières virulentes provenant des sécrétions nasales et salivaires, des exsudats des papules et des croûtes desséchées. La contagion se produit par cohabitation dans des bergeries et les pâturages
- La transmission indirecte à distance à partir de croûtes desséchées riches en virus, qui peuvent persister dans la laine et les peaux 2 à 3 mois, paraît relativement rare. Les insectes et le matériel souillé peuvent jouer le rôle de vecteur mécanique du virus (*FASSI-FEHRI & LEFEVRE, 2003*).

CHAPITRE II : VACCINS ET VACCINATION ANTI-CLAVELEUSE

Les animaux comme les humains, souffrent de maladies nécessitant des soins appropriés. Chaque fois que cela est possible, il est préférable de prévenir ces maladies, plutôt que de les guérir. L'une des méthodes de prévention utilisée, chez l'homme comme chez l'animal, est la vaccination (*IFAH EUROPE, 2008*).

II.1. Définition et principe de la vaccination

La vaccination consiste à introduire chez un individu une préparation antigénique dérivée de l'agent infectieux ou similaire à celui-ci, de manière à lui faire produire une réponse immunitaire capable de le protéger contre les aléas de l'infection naturelle (*GUIDE DES VACCINATIONS, 2012*).

Un vaccin est donc spécifique à une maladie. La production d'anticorps diminue progressivement dans un délai plus ou moins long, fixant ainsi la durée d'efficacité du vaccin. Les vaccins sont inoculés soit par injection (intra musculaire ou intra dermique), soit par voie orale.

II.2. Composition d'un vaccin

Le vaccin contient un certain nombre d'éléments destinés à améliorer son immunogénicité et sa stabilité. Il est constitué de :

II.2.1. Antigènes vaccinaux

Le principal ingrédient de la plupart des vaccins est l'agent infectieux ou une partie de celui-ci, tué ou atténué, qui stimule le système immunitaire pour qu'il puisse reconnaître et prévenir la maladie à l'avenir (*VACC, 2004*).

II.2.2. Adjuvants

L'adjuvant peut être défini comme étant :

- Une substance qui assure une plus grande efficacité et une plus longue durée de protection contre le pathogène visé en favorisant l'immunogénicité d'un vaccin (*UPMC, 2010*).

Une substance ajoutée pour accélérer, prolonger ou renforcer la réponse immune spécifique induite par le vaccin (réponse orientée vers l'antigène ciblé par le vaccin) quand il est utilisé conjointement avec cet adjuvant.

Divers adjuvants sont ainsi couramment utilisés par les fabricants de vaccins pour «surstimuler » le système immunitaire, afin d'augmenter la réponse à un vaccin.

II.2.3. Résidus du processus de fabrication

La production de vaccins implique des passages sur cultures cellulaires ou bien l'utilisation d'œufs embryonnés. Des résidus peuvent se retrouver en faibles concentrations dans le produit fini.

II.2.4. Les conservateurs

Ce sont des additifs qui préviennent l'altération des vaccins, et contribuent ainsi à leur *conservation*. Les conservateurs ont pour but de maintenir la qualité biologique des vaccins et de les rendre aptes à supporter des variations physiques (*UPMC, 2010*).

II.2.5. Les contaminants

Ce sont des éléments indésirables et le procédé de fabrication doit garantir l'absence de contaminants microbiens ; néanmoins un seuil maximal de résidus toxiques est autorisé (*GREZEL, 2006*).

II.3.Effets indésirables et risques liés à l'utilisation des vaccins

En règle générale, les vaccins sont bien tolérés. Comme cela est le cas pour les médicaments efficaces, on peut observer occasionnellement des effets secondaires également avec les vaccins.

La plupart des effets secondaires, tels qu'un gonflement, une fièvre, une rougeur ou un durcissement du site d'injection, qui traduisent une inflammation locale qui entraîne le déclenchement de la réponse immunitaire recherchée par la vaccination- ne sont que passagers et disparaissent par la suite (*CRUCCELL, 2009*).

Dans de très rares cas, la vaccination peut entraîner des effets indésirables sérieux et, exceptionnellement mortels.

II.4. Les types de vaccins

Les vaccins peuvent être préparés de différentes manières. On utilise pour cela soit le micro-organisme en entier, soit une partie de celui-ci ou une sécrétion de celui-ci. Toutes les techniques visent à diminuer ou supprimer le pouvoir pathogène de l'agent infectieux ou de la toxine contenu dans le vaccin, tout en gardant son pouvoir immunitaire (**VACC, 2004**).

Dans tous les cas, la capacité du micro-organisme à induire une réponse immunitaire est conservée tandis que sa capacité à provoquer une maladie est éliminée (**IFAH EUROPE, 2008**).

II.4.1. Vaccins issus d'agents infectieux inactivés

Vaccin contenant une forme inactivée de l'agent infectieux. Le virus, la bactérie ou la toxine est inactivé, généralement sous l'effet d'un produit chimique. On évite ainsi qu'il se multiplie et provoque la maladie. (**VACC, 2004**).

L'avantage est que ce vaccin diminue les risques de réaction allergique (hypersensibilisation). Mais les cellules ne se reproduisant pas, l'organisme ne garde pas beaucoup de cellules efficaces en mémoire et perd vite sa capacité de réponse rapide à l'intrusion de l'antigène. Il est donc nécessaire d'effectuer des rappels pour entretenir la mémoire immunitaire.

II.4.2. Vaccins issus d'agents vivants atténués

Vaccin contenant une forme atténuée de l'agent infectieux. Le virus ou la bactérie est atténué par divers procédés afin que son agressivité vis-à-vis de l'organisme soit faible, voire nulle (**VACC, 2004**).

L'avantage par rapport aux autres vaccins, c'est que les cellules comme elles sont vivantes, peuvent se reproduire et donc maintiennent la réaction immunitaire. L'organisme va donc mettre énormément de cellules en mémoire et le rappel de vaccin sera inutile. Mais on prend aussi le risque qu'une mutation redonne son caractère virulent à l'agent vaccinal.

II.4.3. Vaccins synthétiques

Ces vaccins sont constitués à partir des molécules de surface des agents infectieux afin d'obtenir des réponses immunitaires et introduire le virus concerné.

L'avantage est que si on sélectionne par exemple un morceau de membrane présent chez plusieurs antigènes, l'organisme sera protégé contre tous ces antigènes de façon efficace. Mais les antigènes sont sujets de mutations et ce vaccin nécessite comme les autres de nombreux rappels

II.4.4.Vaccins constitués de toxines inactivées

C'est un vaccin qui contient les toxines responsables de la maladie, sécrétées par l'agent pathogène qui seront isolées et traitées afin de les rendre inoffensives tout en conservant leurs propriétés immunologiques. Elles sont purifiées et transformées pour former le vaccin final ou les anatoxines (*IFAH EUROPE, 2008*).

II.5.Préparation des vaccins

II.5.1.Objectifs

Un vaccin doit d'être :

- Efficace : il doit conférer une immunité active spécifique qui s'installe rapidement et de longue durée.
- Inoffensif : il ne doit pas donner la maladie après injection et ne pas provoquer de très fortes réactions vaccinales.

II.5.2 Pré-requis essentiels

- Connaître parfaitement l'agent de la maladie.
- Pouvoir produire l'agent en grande quantité.
- Avoir à disposition une technique bien établie et reproductible pour transporter cet agent, enlever le pouvoir pathogène tout en conservant le pouvoir immunogène.
- Disposer de méthodes de contrôles sûres.

II.5.3.Etapes de la fabrication

a. Obtention de la souche

- Connaître parfaitement l'agent et pouvoir le produire en grande quantité.
- Lot de semence.

Souche de la bactérie ou de virus bien identifiée par des données historiques aucun autre microorganisme autre de la souche ne doit être présent.

- multiplication et récolte.
- Conditions opératoires définies et codifiés.

- Milieux de culture exempts de substances toxiques ou allergisantes, sérum animal autorisé uniquement au stade de la croissance cellulaire.
- Antibiotiques : Streptomycine et pénicilline interdite (sauf cas justifiés)

b. obtention du vaccin

- vaccins inactivés

Méthode d'inactivation : permettent de retirer à l'organisme pathogène tout pouvoir de reproduction sans altérer les déterminants antigéniques soit par :

- Méthode physique (chaleur, UV,...)
- Méthodes chimiques (Formaldéhyde...)
- Vaccins atténués

Atténuation du pouvoir pathogène par mutation de la souche d'origine.

c. formulation des vaccins

- Vrac final

Préparé par mélange aseptique des différents ingrédients du vaccin.

- Adsorbants (hydroxyde d'aluminium, phosphate d'aluminium...).
- Conservateur microbien : peuvent être ajoutés dans le cas de vaccins liquides.
- Protecteurs de lyophilisation (macromolécules, sucres...).
- Isotonisants.
- Substances tampons.
- Lot final

Préparé par répartition aseptique du vrac final dans des récipients stériles.

d. contrôles

- Avant fabrication : identification et qualité de la souche utilisée
- En cours de fabrication : contrôle des conditions de culture, contrôle des opérations mise en œuvre.
- Sur le produit fini
- Agents d'inactivation dans le produit final.
- Adsorbant pour dose unitaire.
- Teneurs en eau pour les vaccins cryodéshydratés.
- Contrôles de l'efficacité propre à chaque vaccin

- Mesure du titre en virus-production d'anticorps
- Protection contre une dose d'antigène
 - Contrôle de l'innocuité.
 - Essai de stérilité.

e. conservation

Suivi de la stabilité pendant toute la durée de la validité.

Conditions de conservation : +5°C à -3°C à l'abri de la lumière.

Les vaccins liquides et adsorbés ne doivent pas être congelés.

f. étiquetage

- Nom de la préparation.
- Référence qui identifie le lot final.
- Date de péremption
- nom et concentration du conservateur antimicrobien
- nom des antibiotiques, adjuvants et stabilisants présents
- mention des substances pouvant provoquer des réactions secondaires,
- des contre-indications pour l'utilisation du vaccin
- pour les vaccins cryodéshéchés : nom ou composition du liquide de reconstitution à rajouter (**BATOU, 2012**).

II.6. Principaux vaccins anti-claveleux anciennement utilisés

- **Virus Dilué**

Afin d'éviter les réactions violentes et la généralisation, et de préserver le virus, le claveau obtenu à partir d'animaux inoculés est dilué dans de l'eau physiologique.

Pour déterminer la dilution la plus inoffensive et la plus efficace et la plus efficace du virus, différentes dilutions (0.5 ml de chacune) sont inoculées par la voie intradermique à des moutons sensibles. La dilution de virus qui provoque une réaction locale avec formation d'un nodule sera choisie pour la vaccination. En général, les moutons inoculés avec ce virus présentent des réactions assez sévères accompagnées de fièvre.

DELPY & RAFYI en 1947 ont dilué le virus claveleux au 1/200 en eau physiologique et ont employé 0.2 ml pour immuniser les moutons par une inoculation sous la queue.

La validité du vaccin ainsi produit est de courte durée et l'apparition d'épizooties à la suite de l'utilisation de ce virus vaccinal a été rapportée.

- **Virus affaibli par des agents physiques ou les produits chimiques**

Les expériences de DUCLERT & CONTE cités par MUZZAFAR ont montré que l'inoculation du virus claveleux conservé à une température de 25°C pendant 9 à 23 jours ne provoque pas de généralisation chez les moutons.

DUCLOUX, CORDIER et JEZIC ont étudié l'effet de l'aldéhyde formique, de l'éthanol et du butanol sur le virus claveleux. D'après ces auteurs, l'inoculation de 0.5 ml de virus formolé à 1.25 pour 1000 ne provoque pas la maladie.

FORGEOT & MAVRIDIS ont observé que le claveau dilué, formolé à 0.1 % protège les moutons contre la maladie quand il est injecté deux fois dans un volume de 0.25 ml et 0.5 ml (**BELKESSAM, 1977**).

- **Vaccins associés**

DUBOIS et collaborateurs ont réussi l'immunisation de moutons contre la clavelée et la brucellose. CORDIER et collaborateurs ont montré la possibilité de l'immunisation des moutons contre la fièvre aphteuse et la clavelée en un seul temps, en mélangeant les deux vaccins. DEPLY et collaborateurs en 1947, ont préparé un vaccin lyophilisé contre la clavelée et le charbon. L'application sur le terrain de ce vaccin s'est révélée désastreuse par la virulence résiduelle du virus claveleux présent dans ce mélange.

RAMYAR & BAHARSEFAT en 1970, ont développé un vaccin mixte contre la clavelée et le charbon en mélangeant une quantité déterminée de virus claveleux atténuée et des spores d'une souche avirulente de *Bacillus anthracis*.

- **Virus vaccinal**

KASAI, GINS & KUNERT ont réussi l'immunisation de mouton avec le virus vaccinal. Ces auteurs pensent que les animaux vaccinés avec le virus ovinisé résistent à l'inoculation du virus claveleux virulent (**BELKESSAM, 1977**).

- **Virus caprinisé**

KASAI et collaborateurs ont mis au point la production d'une grande quantité de l'antigène claveleux sur la chèvre.

Le virus claveleux est injecté par la voie intradermique ou sous cutanée, selon la méthode de BORREL. Le virus caprinisé peut être utilisé pour la vaccination entre le 10^e et le 15^e passage.

RAFYI & RAMYAR ont vacciné les moutons avec le virus variolique de la chèvre. Les animaux ainsi vaccinés et quelques animaux témoins sont alors éprouvés avec le virus claveleux ; seuls les témoins ont présenté des réactions spécifiques de la clavelée. D'après MUNRO, le virus hétérologue ne conférerait pas une immunité aussi solide que celle conférée par le virus homologue (*BELKESSAM, 1977*).

- **Virus lapinisé**

KASAI a injecté le virus claveleux par voie testiculaire à des lapins et a pu réaliser des passages successifs chez cet animal. Il a montré que le virus lapinisé est différent du virus original. MAZZAFFAR rapporte que les moutons inoculés avec le virus lapinisé s'immunisent sans présenter de réactions graves (*BELKESSAM, 1977*).

- **Virus avianisé**

RAO, BALOZ ET GERLACH ont réussi la culture du virus claveleux sur la membrane chorio-allantoïdienne des embryons de poulet. SABBAN, avec la souche virulente du virus égyptien a réalisé 21 passages alternatifs sur mouton et embryon de poulet.

BORISOVICH et collaborateurs ont utilisé avec de bons résultats la souche avianisée K et ont trouvé que cette souche protégeait les moutons pour une durée de 5 mois.

GINO KUNERT ont constaté que le virus avianisé perdait de sa virulence ainsi que son pouvoir antigénique si le nombre de passage est trop élevé (*BELKESSAM, 1977*).

- **Virus naturellement virulent**

La souche d'origine iranienne a été lyophilisée au 5^e passage, et conservée à - 20°C la dilution au 1/100 de ce virus a été utilisée pour l'immunisation des moutons indigènes.

BASKAYA et collaborateurs ont obtenu de bons résultats en utilisant cette souche pour contrôler la maladie en Turquie. Sur le plan prophylactique, ce vaccin n'a pas beaucoup de valeur car l'antigénicité de la souche ne peut être conservée uniformément pendant longtemps.

- **Sérothérapie et séro-clavélisation**

En 1896, DUCLERT a constaté que le sérum des moutons guéris de la clavelée a une propriété thérapeutique et prophylactique. BORREL en 1902 a montré que l'administration de 20 à 30 ml de sérum anti-claveleux, 24 heures avant l'inoculation du virus virulent empêche les réactions graves et la généralisation.

REBEIRO & SUREAU rapportent que le vaccin anti-claveleux lyophilisé, préparé à partir de virus sensibilisé, se conserve 7 mois à la température de 20-25°C, et la durée de l'immunité conférée par ce vaccin dépasse un an (*BELKESSAM, 1977*).

II.7. vaccins anti-claveleux produits en Algérie

Par tradition, l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) a toujours produit du vaccin anti-claveleux pour l'immunisation des moutons et ce depuis 1913. Le vaccin était produit sous forme liquide et il n'a été commercialisé sous sa forme lyophilisée que depuis 1968 (*ARCHIVES DE L'IPA, 2000/2003*).

- **Le vaccin à virus sensibilisé**

C'est un vaccin à virus sensibilisé produit sur mouton selon la méthode de BRIDE & BOCQUET. C'est une technique ancienne qu'on appelle méthode traditionnelle par opposition à la nouvelle méthode développée par le laboratoire qui est la production sur culture cellulaire.

La production du virus (ou claveau) est réalisée par inoculation de la souche vaccinale « souche Casablanca » (provenant de l'Institut Pasteur de Casablanca) par voie intradermique ou sous-cutanée à des agneaux au niveau du flanc (rasé au préalable).

Ce claveau qui est en fait l'exsudat formé au point d'inoculation et désigné sous le terme de « pustule de BORREL » est récolté le 5^e jour après inoculation. On procède ensuite à la sensibilisation du virus c'est-à-dire sa neutralisation partielle par une quantité adéquate d'immun-sérum spécifique.

Pour cela il est procédé au préalable au titrage sur agneau du mélange virus/sérum, en vue de la détermination de la dilution adéquate de sérum, qui mise en présence d'une quantité fixe de virus et inoculée à l'animal, détermine une réaction locale de 2 cm environ, non nécrosée.

Le mélange virus-sérum additionné d'excipient est ensuite réparti puis lyophilisé et le vaccin est livré sous forme de flacons de 100 doses (*ARCHIVES DE l'IPA, 2000/2003*).

Bien que très efficaces, puisqu'il ait fait ses preuves pendant plus de trente ans, ce vaccin présente au niveau de sa production des contraintes :

- Nécessité d'animaux « neufs ou naifs » c'est-à-dire jamais vaccinés contre la clavelée, et provenant de pays indemnes qui ne pratiquent plus la vaccination anti-claveleuse.
- Difficulté parfois d'interprétation du titrage in vivo du mélange virus/sérum
- La quantité du vaccin préparé est tributaire de la disponibilité d'animaux neufs.

Ceux sont des contraintes qui ont conduit l'IPA à développer un vaccin sur culture cellulaire. (*ARCHIVES DE l'IPA, 2000/2003*).

II.8.Le procédé actuellement utilisé en Algérie

Un vaccin anti-claveleux sur culture cellulaire a été mis au point au service de Microbiologie Vétérinaire et d'Epizootiologie de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Il s'agit d'un vaccin vivant atténué, lyophilisé produit par culture de la souche RM 65 sur cellules rénales d'agneau fœtal.

Ce vaccin a remplacé le vaccin traditionnel à virus sensibilisé (souche Casablanca) (*ARCHIVES DE l'IPA, 2000/2003*).


Institut Pasteur d'Algérie

CLAVAX
Vaccin anticlaveleux lyophilisé, à virus atténué,
préparé sur cultures cellulaires

Composition :

- Vaccin lyophilisé : 100 doses vaccinales contenant au moins 10^3 DICT₅₀ chacune.
- Virus vaccinal, souche RM₆₅, obtenu par culture sur cellules rénales d'agneau foetal.
- Solvant : Chlorure de sodium 8,3 ‰
Phosphate monosodique 0,046 ‰
Phosphate disodique 0,13 ‰..... 50 ml

Indications :
Prévention de la clavelée (variole ovine) chez le mouton.

Présentation :

- 1 flacon de lyophilisat contenant 100 doses de vaccin.
- 1 flacon de 50 ml de solvant

Mode d'emploi :
Introduire au moyen d'une seringue stérile 3 ml de solvant dans le flacon de 100 doses de vaccin. Agiter jusqu'à complète solubilisation du vaccin, puis reprendre le mélange, et le réinjecter dans le flacon de solvant. Renouveler l'opération afin de récupérer la totalité des particules virales restant dans le flacon et dans la seringue.

Posologie :
La dose vaccinale par animal est de 0,5 ml de la suspension reconstituée, à injecter par voie sous-cutanée au niveau de l'ars, à l'arrière du coude.
La dose est la même, quels que soit l'âge, le sexe ou le poids de l'animal.

- Primo-vaccination : à partir de 2 mois.
- Rappel : tous les ans.

Immunité :
L'immunité est effective 15 jours après la vaccination. Elle doit être entretenue par des revaccinations annuelles.

Précautions :
Respecter les règles d'asepsie.
Ne vacciner que les sujets en bon état de sante et correctement déparasités.

Effets secondaires :
Une réaction fébrile peut être observée.
Au point d'inoculation peut apparaître un nodule réactionnel, de 2 à 4 cm de diamètre, qui se résorbe en quelques jours.

Délais d'attente :
Aucun.

Conservation :
Le vaccin lyophilisé doit être conservé à température comprise entre + 2 et + 8°C.
Après réhydratation, le vaccin liquide doit être utilisé dans l'heure qui suit.

Validité :
12 mois après la date de fabrication.

Figure 7 : Notice du « clavax » (IPA, 2012).

Tableau III : Effectif des ovins vaccinés contre la clavelée (2004-2011).

Année	Nombre de têtes vaccinées
2004	10 967 900
2005	12 966 674
2006	14 304 481
2007	14 030 129
2008	16 611 262
2009	15 825 229
2010	16 466 510
2011	17 438 557

(DSV, 2011).

II.9. Principe de la culture cellulaire

On appelle culture cellulaire, le maintien en dehors de l'organisme, des cellules non organisées en tissu mais capable de se diviser in-vitro et d'exprimer des métabolismes et des fonctions spécifiques. Trois périodes vont marquer le développement de la culture cellulaire.

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

La période de la culture de tissus (à partir de 1902), Cette période est dominée par Alexis Carrel qui oriente le développement de la culture de tissus suivant trois voies principales:

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

La culture cellulaire proprement dite, n'apparaît qu'à partir de 1952 lors de l'introduction de la trypsinisation des tissus par Moscona en 1952. Il procède à la digestion de tissu d'œuf de poulet avec de la trypsine afin d'obtenir des cellules isolées ou des amas de cellules capables de se diviser in-vitro (MAGNIEZ, 2008).

II.9.1. Les techniques d'obtention des cellules

On distingue deux types de cellules:

- Les cellules libres et circulantes comme les cellules du sang.
- Les cellules en cohésion les unes avec les autres, constituant un tissu.

Les techniques d'obtention de ces deux classes de cellules sont différentes.

- Les cellules circulantes sont obtenues par prélèvement et centrifugation.
- Les cellules organisées en tissus nécessitent la mise en œuvre de techniques plus originales qui peuvent être divisées en deux groupes: la méthode par dissection et la méthode par digestion enzymatique. (*MAGNIEZ, 2008*).

a. La méthode par dissection

Cette méthode est la plus ancienne. Elle a permis aux précurseurs de la culture de tissu d'obtenir les premières cellules in-vitro.

- **La méthode de Carrel**

Consiste à prélever un morceau de tissu qui est réduit en un très petit rectangle et déposé à la surface d'un mélange de 2 gouttes de plasma de coq et de 2 gouttes d'extrait embryonnaire à 50%. Après un séjour de 24 heures en incubateur, on voit migrer les premières cellules à partir de l'explant.

La méthode de dissection consiste à couper en fragment d'environ 1 à 4 mm³ le tissu que l'on réduit encore à l'aide d'une pince. Ces fragments sont ensuite placés dans un flacon de culture contenant un milieu nutritif. Les cellules vont migrer à partir des différents fragments puis se multiplier. Cette méthode s'appelle également la méthode des explants.

- **La méthode Jensen**

Les fragments de tissus de 1 mm³ sont placés sur un disque de papier filtre qui repose sur un support métallique dans une boîte de pétri. Les cellules qui prolifèrent à partir du fragment du tissu traversent les pores du papier et se fixent au fond de la boîte. Cette technique donne l'avantage d'une séparation constante entre l'explant et les cellules migrantes évitant l'étape délicate de l'élimination de l'explant lorsqu'une couche subconfluente est obtenue.

- **La méthode mécanique**

Cette technique s'applique pour des tissus mous comme le thymus, la rate. Elle consiste à frotter le tissu sur une grille puis de filtrer et centrifuger. On peut également dilacérer les tissus à l'aide d'une pipette en verre en pipetant et refoulant les tissus.

- b. La méthode par digestion enzymatique**

Les enzymes utilisées sont des enzymes protéolytiques qui digèrent la trame protéique qui entoure les cellules. On utilise souvent la trypsine à une concentration de 0,5 à 2,5 g/l dans une solution saline (*MAGNIEZ, 2008*).

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Objectif

Notre étude porte sur l'étude des différentes phases de production du vaccin anti-claveleux Clavax® et l'identification des différentes conditions nécessaires à son optimisation. Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de production et de développement des vaccins viraux vétérinaires de l'Institut Pasteur d'Algérie (Kouba) pendant une durée de 15 mois du 01/02/2011 au 01/04/2012.

II. Matériels & Méthodes

II.1. Matériels

II.1. 1. Matériels non biologiques

- o Plateaux stériles.
- o boîtes de pétri stériles.
- o pinces, bistouris, verrerie (pipettes graduées...).
- o Erlenmeyers.
- o Agitateur magnétique, entonnoirs stériles.
- o Tubes à centrifugation coniques.
- o Centrifugeuse, étuve, bain marie.
- o Microscope inversé.
- o Micropipettes et embouts correspondants.
- o Réfrigérateur, balance de précision, congélateur.
- o Hotte à flux laminaire.
- o Flacons de culture de 25 cm², boîte de 75 cm²

Cette liste n'est pas exhaustive.

II.1. 2. Matériels biologiques

Le virus vaccinal de la clavelée (Souche RM65) est cultivé sur cellules rénales d'agneau fœtal.

Les fœtus de brebis sont obtenus à partir d'utérus gravides provenant des abattoirs d'El Harrach et d'Hussein Dey.

II.1. 2. A. Souche vaccinale

La souche vaccinale utilisée est la souche RM65. Il s'agit d'une souche originalement isolée d'un foyer naturel de clavelée apparu, il y'a quelques années en Yougoslavie, adaptée aux cultures cellulaires puis atténuée par passage successifs sur cellules rénales de mouton par RAMYAR (Institut RAZI, Iran).

II.1. 2. B. Milieux de culture (Milieux nutritifs)

- **Le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)**

Il s'agit du milieu d'Eagle modifié par Dulbecco. Il est dissout dans de l'eau distillée puis stérilisé par filtration (pH = 7,4). Cette préparation est riche en éléments nutritifs indispensables à la croissance des cellules. Elle contient des vitamines, du glucose, des acides aminés et des sels minéraux. Cependant, ce milieu synthétique ne suffit pas à lui seul à faire démarrer une culture de cellules. Il est recommandé d'ajouter une substance naturelle comme le sérum de veau fœtal (SVF) qui est riche en facteurs de croissance permettant à la cellule de s'accrocher au support avant de commencer à se diviser.

- **Le sérum de veau fœtal (SVF)**

Le sérum de veau fœtal est utilisé comme complément de la culture cellulaire utilisé pour les étapes de préparations cellulaires et tissulaires. Il contient les facteurs de croissance nécessaires à la prolifération des cellules.

II.1. 2. C. Solutions et réactifs

- **HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)**

Solution saline équilibrée sans calcium, sans magnésium, sans rouge phénol, utilisée pour les étapes de préparations cellulaires et tissulaires (rinçage, dilution, transport).

- **PBS (Phosphate Buffered Saline)**

Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate di-sodique, du phosphate mono-potassique et peu de chlorure de potassium.

Ce tampon sert surtout à rincer les cellules lorsqu'il faut enlever toute trace de milieu avant de les traiter.

- **Trypsine-versène**

C'est une solution de P.B.S à laquelle on ajoute de la trypsine à 1 pour 1000 et du versénate à 0,5 pour 1000. Elle est surtout utilisée pour dissocier le tapis cellulaire d'un flacon de culture. Elle permet d'effectuer des passages de cellules pour avoir des cultures dites secondaires.

- **Trypsine-HBSS**

C'est une solution de HBSS à laquelle on ajoute de la trypsine à 3 pour 1000. On l'utilise pour dissocier les fragments d'organes en unités cellulaires.

- **Rouge de phénol**

Il s'agit d'un indicateur de pH. Sa forme acide est jaune, sa forme basique est rouge. Sa zone de virage dans l'échelle de pH est située entre 6.6 et 8.4.

II.2. Méthodes

La préparation du vaccin comporte les étapes suivantes :

1. La production de cellules rénales :
 - Extraction.
 - Isolement.
 - Mise en culture des cellules rénales fœtales.
2. La production de la culture virale.
3. La préparation du vaccin en vrac (le Bulk).
4. La répartition et la lyophilisation du vaccin.

II.2.1. La production de cellules rénales

II.2.1.A. Extraction du fœtus

L'utérus est lavé à l'eau du robinet, puis placé dans un plateau émaillé stérile. La paroi utérine est ensuite incisée pour permettre l'extraction du fœtus et son transfert sur un autre plateau émaillé stérile. (Figure 8)



Figure 8 : Extraction du fœtus.

Le plateau contenant le fœtus est transféré sous hotte, pour être aspergé dans sa totalité d'alcool chirurgical. La paroi abdominale est incisée à hauteur des reins et ces derniers sont extraits et déposés dans une grande boîte de pétri stérile. (Figure 9)

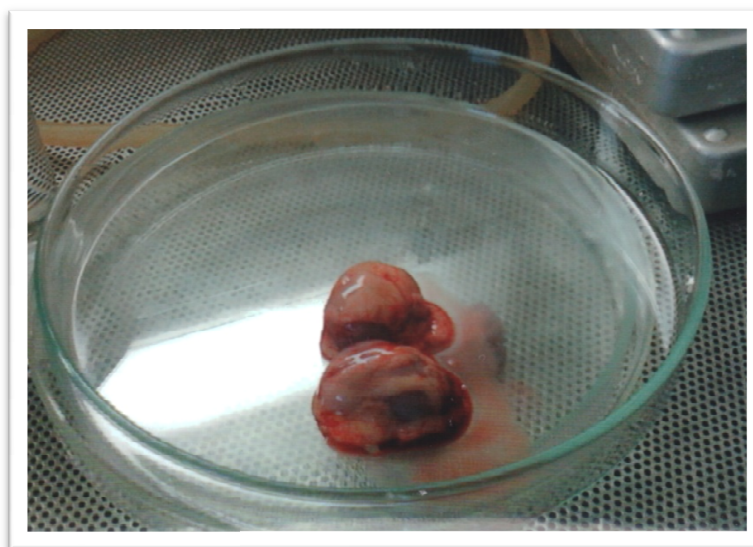


Figure 9 : Extraction des reins.

II.2.1.B. Isolement (Trypsination du cortex rénal)

Le rein est d'abord décapsulé pour le débarrasser de toutes ses membranes. La couche corticale est ensuite soigneusement raclée dans sa totalité à l'aide d'un bistouri.

La masse tissulaire est ensuite hachée menue pour être transféré dans un Erlenmeyer

à trypsination muni d'un barreau aimanté auquel on rajoute 100ml de PBS à 37°C sous agitation. La solution est laissée en décantation quelques instants puis le surnageant est éliminé. On procède à trois lavages. Cent millilitres (100 ml) de trypsine-HBSS à 37°C sont rajoutés à l'Erlenmeyer, et mis à incubation sous agitation pendant une heure à 37°C.

Le contenu de l'Erlenmeyer, est filtré à travers une gaze montée sur entonnoir (stérile) sous hotte et le filtrat est réparti à parts égales dans des tubes à centrifuger coniques (volume 50 ml). Les tubes sont ensuite centrifugés à 250 tours/min pendant 10 mn à + 4°C et le culot ainsi obtenu constitue l'amas de cellules rénales à mettre en culture.

II.2.1.C. Mise en culture des cellules RM (Cellules rénales d'agneau fœtal)

A. Le Calcul de la quantité de culot obtenue a été réalisé comme suit :

Le culot est repris dans 5 ml de milieu DMEM à 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) et homogénéisé par aspirations/refoulements successifs à la pipette. La quantité totale de la solution ainsi obtenue est mesurée.

Quantité de culot = la quantité de solution totale – quantité de milieu ajoutée au culot

NB : La quantité de milieu de culture est préparée en fonction de la quantité de culot et de la concentration cellulaire.

B. La solution bien homogénéisée est versée dans la quantité correspondante de milieu en tenant compte de la quantité de milieu déjà utilisée pour reprendre le culot.

C. le culot à été repris dans 5 ml de milieu, la solution totale obtenue est de 7 ml.

Notre culot est donc de $7\text{ml} - 5\text{ml} = 2\text{ml}$

Si on fait une dilution de 1 pour 200 : préparer une quantité de milieu de $200\text{ml} - 5\text{ml} = 195\text{ml}$

Verser la solution totale de 7 ml dans 195 ml de milieu.

D. Après une agitation soigneuse, la suspension cellulaire obtenue estensemencée dans des boîtes de cultures (figure 9).

- o Boîte de 150 cm^2 : 100ml / boîte.
- o Boîte de 75 cm^2 : 50ml/ boîte.
- o Boîte de 25 cm^2 : 15 ml / boîte.

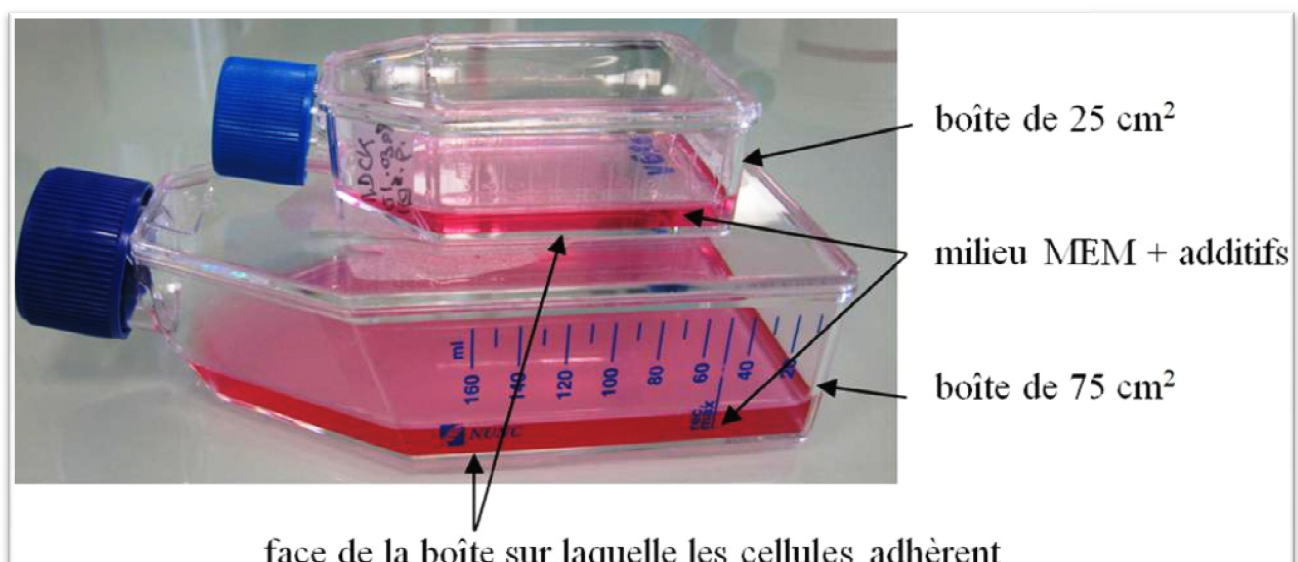


Figure 10 : boîtes de culture

- E. Les boîtes sont annotées (type cellulaire, date et numéro de passage) et mises à incuber dans une étuve à CO₂ à 37°C (figure11).



Figure 11 : incubation des boîtes de culture.

II.2.1.D. Trypsination des cellules rénales de 1^{er} explant

Les cellules RM peuvent subir un certain nombre de passage par trypsination successives, théoriquement une trentaine de passage, mais dans la pratique, en production, les cellules doivent être utilisées au 2^e ou 3^e passage.

Les boîtes à trypsinées étaient sélectionnées au moins 48 heures à l'avance et seules étaient retenues celles présentant un tapis confluent.

- **Procédure opératoire**

La boîte à trypsiner est vidée de son milieu, pour permettre le rinçage du tapis cellulaire deux fois avec 5 ml de PBS (Phosphate buffed saline) avant de rajouter de la trypsine-versène, en quantité suffisante pour recouvrir le tapis. Le surnageant est ensuite délicatement éliminé (procéder en surveillant le tapis, car la trypsine agit très vite). La trypsine est rajoutée à nouveau, pour être rincée, le surnageant est éliminé mais en laissant un mince film de trypsine à la surface du tapis. Dès que le tapis cellulaire commence à se décoller, le processus est accéléré par petits tapotements

secs de la boîte. Dix (10) ml de milieu DMEM sont rajoutés et les cellules trypsinées remises en suspension par aspiration-refoulement énergique au moyen d'une pipette.

- **Répartition de la suspension cellulaire dans les boîtes de cultures**

La suspension, est répartie à parts égales entre les boîtes correspondantes correctement marquées (nom des cellules et numéro de passage. Ex : RM1) et contenant déjà la quantité adéquate de milieu DMEM (figure12).

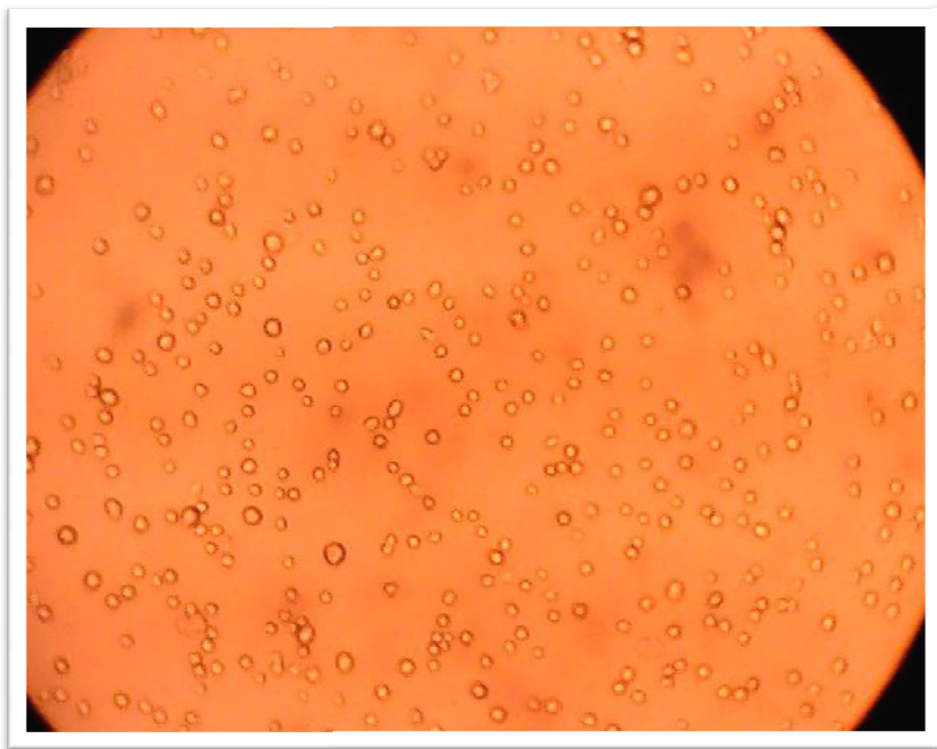


Figure 12 : cellules rénales trypsinées en suspension observées sous microscope optique inversé.

II.2.2. La production de la culture virale

II.2.2.A. Culture virale du virus de la clavelée sur cellules de rein d'agneau fœtal (RM)

La culture du virus de la clavelée est réalisée sur des cultures de cellules de reins de fœtus d'agneaux, provenant des abattoirs d'Alger.

Généralement on utilise des boîtes de cultures cellulaires de 75 cm², 150 cm² voir même des rollers de 1 litre dédiés à la culture virale.

Les cultures cellulaires présentant une tapis cellulaire confluent et un bon état de développement généralement à leurs 2^e ou 3^e passage (RM2 ou RM3).

- **Mode opératoire**

- 1- Les boites ou les rollers présentant un tapis cellulaires confluent sont sélectionnées.
- 2- L'inoculum est préparé à partir de la banque virale ou des lots de semences aliquotes.
- 3- Une quantité suffisante d'inoculum est préparée pour toutes les boites ou rollers à raison de :

Boites de 75 cm ²	0.5 ml d'inoculum
Boites de 150 cm ²	1 ml d'inoculum
Rollers de 1 litre	5 ml d'inoculum

- 4- L'inoculum est décongelé et maintenu à +4°C jusqu'au moment de l'inoculation.
- 5- Les boites de culture sont ensuite inoculées avec la quantité correspondante d'inoculum (voir tableau ci-dessus).
- 6- L'inoculum est laissé à adsorber pendant 30 minutes dans une étuve à CO₂ à 37°C.
- 7- Une quantité suffisante de milieu DMEM à 2% de SVF est rajoutée aux boites utilisées et celles-ci remise en incubation à 37°C pendant 5 à 6 jours.

Boites de 75 cm ²	30 ml
Boites de 1502 cm ²	75 ml
Rollers de 1 litre	150 ml

- 8- Des boites de culture témoins cultivées dans le même milieu et dans les mêmes conditions sans inoculation virale sont également préparées.
- 9- Une Lecture quotidienne des boites sous microscope est réalisée afin de détecter l'effet cytopathogène (ECP) (figure 13).

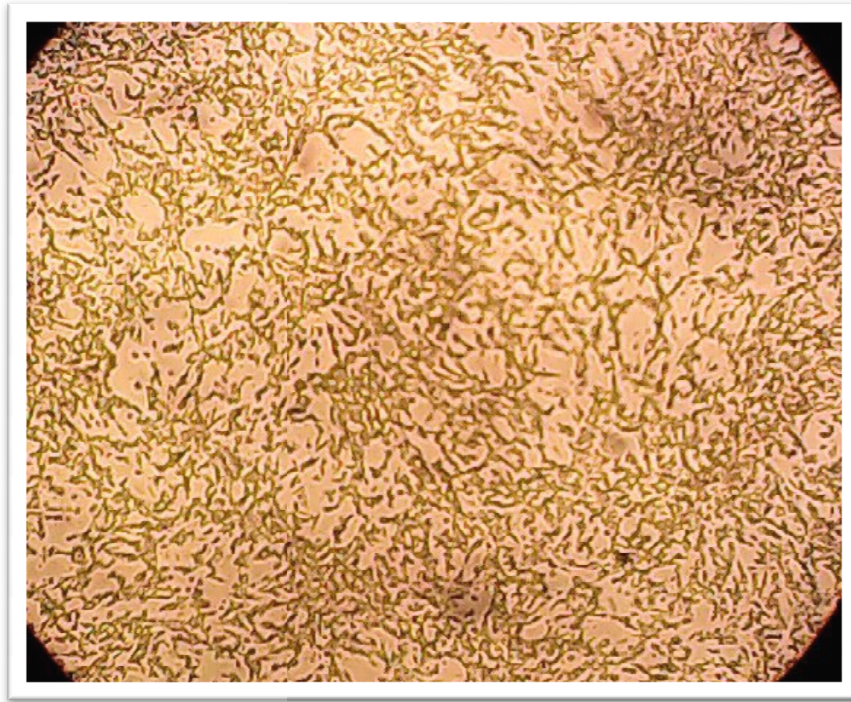


Figure 13 : l'effet cytopathogène (ECP) observé sous microscope optique inversé.

II.2.2.B. Récolte et titrage de la culture virale

Les cellules inoculées sont examinées quotidiennement jusqu'à l'apparition de l'effet cytopathogène (ECP) qui survient en générale vers le 5^e jour après l'inoculation.

Les boîtes sont retirées de l'étuve dès que l'ECP atteint 80% de la couche cellulaire. Elles sont placées au fur et à mesure au congélateur.

Les cellules sont alors soumises à un cycle de 3 phases de congélation/décongélation. Cette opération a pour but de casser les cellules afin de libérer le maximum de particules virales dans le milieu. A la fin de la dernière phase de décongélation, un échantillon est prélevé de chaque boîte pour les contrôles de stérilité.

Après les contrôles de stérilité le contenu des boîtes est récolté en pool, dont un échantillon est prélevé pour le titrage de la suspension.

La culture virale est conservée à -20°C jusqu'au moment de l'ajustement du titre avec du milieu (10^8 DICT₅₀/ml au minimum) et de son mélange avec le support de lyophilisation.

II.2.3. La préparation du vaccin en vrac (Bulk viral)

Le Bulk est constitué de 5 litres de récolte virale diluée dans du DMEM selon le titre et de 5 litres d'excipient de lyophilisation.

La quantité finale du Bulk est de 10 litres à lyophiliser dans des flacons type pénicilline de 5 ml à raison de 1ml de lyophilisat par flacon.

Théoriquement on obtient 10.000 flacons de vaccin lyophilisés, mais pratiquement en raison des pertes lors de la lyophilisation on arrive à obtenir ≈ 9800 flacons lyophilisés.

Chaque flacon nous permet de reconstituer ≈ 100 doses vaccinales.

D'où un lot de vaccin ≈ 9800 flacons ≈ 980.000 doses vaccinales.

II.2.4. La répartition et la lyophilisation

La lyophilisation, aussi appelée séchage à froid, est un procédé qui consiste à retirer l'eau d'un médicament afin de le rendre stable à la température ambiante et de faciliter sa conservation. On peut décomposer la lyophilisation en trois étapes principales : la congélation, la dessiccation primaire ou sublimation et enfin la dessiccation secondaire ou séchage final.

II.2.4. A. La congélation

La première étape consiste à congeler le vaccin pour que l'eau qu'il contient soit transformée en glace. La température doit rester plus basse que $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tout au long du processus de lyophilisation.

II.2.4.B. La dessiccation primaire ou sublimation

L'étape suivante permet la sublimation de la glace. La sublimation est un principe physique simple. C'est le passage d'une substance de l'état solide à l'état gazeux directement. On dessèche donc le vaccin ou le médicament en le mettant sous vide : la glace devient de la vapeur et elle est récupérée.

II.2.4.C. La dessiccation secondaire ou séchage final

Cette dernière étape débute lorsque toute la glace est sublimée. Le vaccin est alors séché. La température s'élève spontanément une fois que toute l'eau a été sublimée. Une température variant entre 20 et $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant deux à six (6) heures permet d'amener une humidité résiduelle entre 2 et 8 %.

III. Le contrôle du vaccin

Le vaccin subit deux séries de contrôles :

- o Les contrôles en cours de production
- o Les contrôles du produit fini

III.1. Contrôles en cours de fabrication

III.1.1. Souche vaccinale

L'identité et la pureté de la souche vaccinale, certifiées par le laboratoire fournisseur (laboratoire de Référence FAO pour l'Afrique) vont être de nouveau vérifiées par le laboratoire de l'Institut Pasteur : la souche va être neutralisée avec un immun sérum spécifique, puis sera inoculée à des cellules.

III.1.2. Contrôle des cellules

En cours de culture, les cellules sont contrôlées pour ce qui concerne leur morphologie, ainsi que pour l'absence d'ECP anormal

En cours de production des boîtes de culture de cellules témoin, non infectées sont maintenues en parallèle avec les cellules inoculées jusqu'à la récolte de la suspension virale, puis subissent au moins un passage supplémentaire pour observation ultérieure

Les cellules sont contrôlées pour l'absence du virus de la BVD : Diarrhée Virale Bovine

III.1.3. Contrôle de stérilité des milieux utilisés pour la culture cellulaire

- **Milieu de culture**

Le milieu de culture pour la croissance des cellules et leur mise en survie après inoculation est contrôlé avant chaque utilisation au niveau de la stérilité bactérienne et fongique

Le milieu de culture est stérilisé par filtration sur membranes filtrantes de 0.22µm de porosité

Le volume courant de filtration de milieu est de 10 litres.

Après chaque filtration il est procédé à un contrôle du système de filtration par la méthode du « point bulle » puis chaque flacon de milieu (flacon de 1 litre) est contrôlé individuellement en inoculant

- o Un tube de bouillon nutritif incubé 7 jours à 37°C pour la recherche de germes aérobies.
- o Un tube de thioglycolate incubé 14 jours à 37°C pour la recherche de germes anaérobies.
- o Un tube de milieu de Sabouraud incubé 14 jours à température de laboratoire pour la recherche de champignons microscopiques.

Les milieux de culture utilisés pour les tests de stérilité sont préparés par le Service des Milieux de Culture de l'Institut Pasteur d'Algérie.

- **Le sérum de veau fœtal**

Le sérum est contrôlé avant chaque utilisation au niveau de la stérilité bactérienne et fongique

Les milieux de culture utilisés pour cela sont les mêmes que ceux utilisés pour le contrôle du milieu de croissance des cellules.

III.1.4. Contrôle de stérilité des récoltes virales

Chaque récolte de suspension virale est soumise au contrôle de sa stérilité.

Ce contrôle portant sur la stérilité bactérienne et fongique est conduit de la même façon que pour le milieu de culture.

III.2. Les contrôles du produit fini

Une fois l'opération de lyophilisation terminée, ce vaccin est soumis à un certain nombre de tests relatifs à l'innocuité, la durée de conservation et l'immunité conférée (**BEL KESSAM, 1977**).

- **Innocuité**

Parfaite innocuité pour le mouton algérien .il n'a été observé, semble-t-il, ni réaction locale, ni ulcération, ni éruption généralisée, ni transmission à partir d'animaux vaccinés, ni mortalité consécutive à la vaccination (*BEL KESSAM, 1977*).

- **Durée de conservation**

Le vaccin conserve toute son activité après 6 mois de conservation + 4°C, conserve toute son activité pendant 7mois à la température 25°C, résiste à plusieurs mois de séjour à + 37°C. L'immunité conférée est solide et dure pendant au moins un an (*BEL KESSAM, 1977*).

IV. RESULTATS & DISCUSSION

Les données collectées au cours de notre travail expérimental réalisé au sein du laboratoire de production de vaccins viraux vétérinaires de l'Institut Pasteur d'Algérie qui se voulait dans un premier temps comme une initiation pratique aux techniques de production d'un vaccin et dans qui a eu dans un second temps a eu pour objectif d'étudier les différentes phases de production du vaccin anti-clavelée : Clavax ® (détaillées dans la partie matériels et méthodes) afin d'en analyser les principaux points critiques.

Il ne ressort de la présente étude, que certaines étapes de production gagneraient à être optimisées par l'adoption de mesures relativement simples :

1. Origine et statut du fœtus

Les cultures de cellules rénales utilisées étaient extraites à partir de fœtus d'agneau obtenus à partir d'utérus de brebis gravides provenant des abattoirs d'El Harrach et d'Hussein Dey (officiellement des découvertes d'abattoirs). Malheureusement, la traçabilité de ces fœtus s'arrête là, et leur origine reste indéterminée par conséquent. De plus aucune information n'est disponible sur le statut virologique, bactérien ou parasitaire des brebis gravides et par conséquent sur celui des fœtus d'agneau utilisés, ce qui constitue une source potentielle de contamination. Il serait par conséquent judicieux que l'IPA dispose de son propre élevage d'ovins à l'origine et au statut infectieux contrôlés.

2. Contrôle de l'environnement de production

Le contrôle de l'environnement de production et en tout premier lieu le traitement de l'air des aires de production nous paraît primordiale dans toute production de produits injectables et d'autant plus qu'il s'agit de produits biologiques comme les vaccins. Or, il nous a été aisé de constater l'absence notamment de :

- Traitement de l'air dans l'unité de production étudiée ;
- Confinement des salles de culture (absence de sas, d'extracteurs ...)
- Tenues spécifiques et adaptées à ce type de production.

Une meilleure conception des structures de production et la mise en place d'équipements adaptés permettrait de corriger facilement ces carences et d'éviter des contaminations des lots de vaccins produits.

3. Détermination du nombre de passage cellulaire

Au cours de notre étude nous avons pu constater qu'il est plus approprié de ne pas utiliser les cellules primaires cultivées au-delà de trois passages cellulaires. En effet l'utilisation de cultures cellulaires à nombre de passage plus élevée s'accompagne d'une perte de viabilité cellulaire (vieillesse et de mort cellulaire) et d'une dédifférenciation cellulaire avec pertes des propriétés des cellules (morphologiques et métaboliques). Ceci aurait pour conséquence, une diminution des rendements qualitatifs et quantitatifs de production du vaccin/

De plus une diminution du nombre de trypsination par l'utilisation de trypsine plus puissante, permettrait sans doute d'améliorer la viabilité des cellules en culture.

4. Numération cellulaire

Il nous a été aisé de constater qu'à aucune étape des cultures, une quantification précise des cellules et le contrôle de leur viabilité n'étaient effectuées et que par conséquent le nombre de cellulesensemencées était subjectivement déterminé, ce qui pourrait allonger les durées de production et diminuer également son rendement.

5. Incubateur cellulaire

Actuellement un seul incubateur à CO₂ est utilisé pour l'ensemble des phases de production (cultures cellulaires, multiplication virale, ECP). Afin d'éviter une contamination des différents compartiments de production, il serait judicieux de disposer de plusieurs incubateurs cellulaires :

- o Un incubateur à CO₂ pour les cultures cellulaires.
- o Un incubateur à CO₂ pour la culture virale.
- o Un incubateur à CO₂ pour l'ECP.

6. Conservation

Même constat concernant la conservation de la banque virale, des milieux de culture, des réactifs... qui se fait dans le même congélateur. Une séparation au moins en différents compartiments permettrait d'éviter tout risque de contamination ou de perte biologique.

7. Comptage des particules virales

A notre connaissance il n'y a pas de comptage régulier des particules virales, il faudrait réaliser une numération régulière des particules virales après conservation, afin de s'assurer de la qualité et de la charge de l'inoculum viral.

8. Effet Cyto-Pathogène

Le titrage des vaccins repose sur la technique « ECP », or cette dernière reste une technique subjective qui dépend de l'œil du manipulateur et dont les résultats pourraient être faussés par une éventuelle contamination sous-jacente, ce qui requiert par conséquent une vigilance accrue du laboratoire vis-à-vis de toute contamination ou perte de stérilité dans la chaîne de production.

9. Conception de l'unité de production

La production du Clavax, nécessite le déplacement des lots de vaccins de l'unité de production au lyophilisateur notamment, ce qui constitue un risque potentiel de contamination. Il serait préférable de disposer d'une unité de production dotée d'un lyophilisateur et de respecter le principe de la marche en avant dans la conception de cette unité.

Conclusion

La préservation de notre cheptel ovin, principale source en viande rouge, constitue une priorité dans le programme des services vétérinaires. La stratégie de lutte adoptée consistant en une vaccination massive des ovins et une prise en charge rapide des foyers déclarés, a permis une réduction notable de l'impact de la maladie.

Cependant, l'éradication d'une telle maladie n'est pas chose aisée, notamment en zone d'élevage pastoral, de transhumance et de nomadisme, car le mouvement des animaux et de leurs produits entrave le contrôle vétérinaire.

La prophylaxie, essentiellement médicale, nécessite des vaccins d'innocuité, d'efficacité, de conservation et de commodité d'application satisfaisante.

L'éradication de la clavelée : fléau des hauts-plateaux algériens passe certes par une généralisation de la vaccination, mais la lutte contre la maladie ne peut à notre avis se limiter à la prophylaxie médicale. La prévention médico-sanitaire devrait s'intégrer à un ensemble d'autre action tendant à améliorer le milieu naturel et à remodeler les structures socio-économiques de la steppe. Cet ensemble d'action équivaut à un bouleversement des mentalités et méthodes qui nécessiteront beaucoup de temps et d'effort.

Néanmoins, cette lutte est conditionnée par la mise à disposition d'un vaccin efficace et sure, aussi l'amélioration des conditions de production et leur optimisation d'un vaccin aussi important que le vaccin anti-clavelée devraient constituer une priorité absolue.

ANNEXES BIBLIOGRAPHIQUES

ACHOUR HA., BOUGUEDOUR R., 1999 : Épidémiologie de la clavelée en Algérie.

Rev.sci. tech off. int. Epiz., 1999, 18 (3), 606-617.

ARCHIVES IPA., 2000/2003: Archives de l'Institut Pasteur, T-64, 2000/20003.

BELKESSAM K., 1977 : Contribution à l'étude de la clavelée en Algérie. Thèse pour le doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, pages 50-51.

BERTAGNOLI., 2003 : Construction de poxvirus recombinants pour la vaccination contre la myxomatose et la maladie hémorragique virale des lapins.

BOOS CF., 2009 : Le nez croûteux : diagnostic différentiel des affections du mufle et des naseaux chez les ruminants. Thèse pour le doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Créteil, page 66.

BORREL., 1902 : Expérience sur la filtration du virus claveléux.

CHANTAL J., 2006 : guide pratique de diagnostic et de gestion des épizooties, pages 32-34-36.

DELPY LO., RAFYI A., 1947 : Recherche expérimentale sur le virus de la clavelée, méthode d'immunisation employée en Iran, pages 19, 304.

FAO., 2000 : reconnaître la clavelée - manuel de terrain, pages 7-21.

FASSI-FEHRI M., LEFEVRE PC., 2003 : Principales maladies parasitaires du bétail Europe et régions chaudes. Volume 1, pages 415-424.

IFAH EUROPE., 2008: Animal vaccines: development, registration and production.

MURTY DK., SINGH PP., 1971: Epidemiological studies on an outbreak of sheeppox in a mixed flock in *Uttar Pradesh. Indian J. Anim. Sci.*, 41, 1072-1079.

OIE., 2005 : Clavelée et variole caprine.

RAMYAR H., 1970 : immunisation anticlaveuse. Méthode actuelle de production de vaccin claveux à l'institut d'état des sérums et vaccins Razi-Iran.

RAFYI H., 1960 : progrès réalisé dans la lutte contre les varioles ovines et caprines par la vaccination OIE.

SITES INTERNET

BATOU., 2012 : préparation des vaccins.

Adresse URL : <http://pharmadijon.fr/joomla/phocadownload/ph4/EC%20vaccin%20Complet.pdf>

CRUCELL., 2009 : effets indésirables et risques liés à l'utilisation d'un vaccin.

Adresse URL : http://www.crucell.ch/fr/effet_indesirable

GUIDE DES VACCINATIONS., 2012 : définition et principe de la vaccination.

Adresse URL : http://www.inpes.sante.fr/10000/themes/vaccination/guide-vaccination-2012/pdf/GuideVaccinations2012_Principes_et_bases_immunologiques_de_la_vaccination.pdf#xml=http://search.atomz.com/search/pdfhelper.tk?sp_o=1

GREZEL D., 2006: Types de vaccins-composition et considerations pratiques.

Adresse URL : <http://www2.vet-lyon.fr/ens/immuno/ENVimmuno2A/immun3-06.htm>

MAGNEZ., 2008 : Culture cellulaire.

Adresse URL : <http://biotechnologie.over-blog.com/article-16526675.html>

VACC., 2004 : composition d'un vaccin.

Adresse URL : <http://www.vaccination-info.be/vaccination/vaccination.html>

UPMC., 2010 : composition d'un vaccin.

Adresse URL : [http://www.edu.upmc.fr/sdv/immuno/doc/l3/lv379/cm/cm379_2009-2010/LV379_vaccination_\(bellier\).pdf](http://www.edu.upmc.fr/sdv/immuno/doc/l3/lv379/cm/cm379_2009-2010/LV379_vaccination_(bellier).pdf)

Résumé

La clavelée aussi connue sous le nom de variole ovine, est une maladie qui revêt une importance de plus en plus grande notamment en Afrique et dans les pays du Moyen Orient où l'élevage ovin contribue pour une part importante dans la production de viandes rouges.

En Algérie, cette maladie représente la dominante pathologique la plus importante de l'élevage ovin. Afin d'en juguler les effets, l'État organise des campagnes nationales de prophylaxie et utilise un vaccin à virus modifié produit sur culture cellulaire au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Le présent travail, a eu comme principal objectif, d'étudier les différentes phases de production du vaccin claveleux : Clavax ®, et d'identifier les points critiques de sa production en vue de son optimisation.

Au terme de cette étude il nous paraît nécessaire que

La production du vaccin s'effectue dans des conditions de stérilité rigoureuse.

La traçabilité des fœtus utilisés soit mise en place et leurs statuts infectieux connus.

Séparation des différents compartiments de la production (culture cellulaire et culture virale) soit réalisée, pour éviter tous risque de contamination.

Mots clés : Clavax – Clavelée – Production vaccin – Culture cellulaire

Abstract

Pox also known as sheep pox is a disease that is of importance more and more notably in Africa and the Middle East, where sheep farming accounts for a significant part in the production of red meat.

In Algeria, this disease is the most important dominant disease of sheep. In order to suppress the effects of them, the State organizes national campaigns of disease prevention and uses a vaccine with modified virus produces on cellular culture on the level of the Pasteur Institute of Algeria.

This work had as main objective to study the different phases of vaccine production: Clavax ®, and identify critical points of its production for its optimization. After this study we consider it necessary that :

Vaccine production takes place under strict sterile conditions.

Traceability is used fetal development and their status known infectious.

Separation of the different compartments of production (cell culture and viral culture) is performed, to avoid any risk of contamination.

Keywords: Clavax – Sheep pox - Vaccine production - Cell culture

الملخص

الجدري المعروف أيضا باسم جدري الأغنام من الأمراض التي لها أهمية كبيرة ولا سيما في أفريقيا والشرق الأوسط حيث تشكل مزارع تربية الأغنام جزء كبير في إنتاج اللحوم الحمراء.

في الجزائر هذا المرض هو المرض الأكثر أهمية عند الأغنام. و للحد من أثاره تنظم الدولة حملات وطنية للوقاية باستخدام لقاح ذو فيروس معدل و منتج على زراعات خلايا الكلى في معهد باستور في الجزائر

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو دراسة المراحل المختلفة لإنتاج لقاح الجدري وتحديد النقاط الحرجة أثناء إنتاجه وذلك من أجل تحسين إنتاجه و فعاليته نتائج عملنا هذا أوضح

ينبغي لإنتاج اللقاح ظروفًا صارمة التعقيم من الضروري تتبع الأجنة التي تم الحصول عليها من أجل تفسير أفضل للنتائج لا بد من الفصل بين الإنتاج الخلوي و الإنتاج الفيروسي لتجنب أي مخاطر العدوى

الكلمات المفتاحية الجدري – إنتاج اللقاح – الزراعات الخلوية