

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

École Nationale Supérieure Vétérinaire



Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Docteur

en

Médecine vétérinaire

THÈME

Suivi de

la fabrication du vaccin antirabique

humain à l'institut PASTEUR d'Alger

Présenté par :

Melle BEN MENSOUR Cerine

Mr BENTARZI Mohamed Amine

Soutenu publiquement, le 25 novembre 2020 devant le jury :

Mme MARNICHE.F

Professeur (ENSV)

Présidente

Mme BOUKHORS.K.T

Professeur (ENSV)

Examinatrice

Mr LAHOUASSA.H

MCA (ENSV)

Promoteur

Mr ISAAD.M

Directeur de la production à
l'institut Pasteur

Co-promoteur

Déclaration sur l'honneur

Je soussigné BENTARZI Mohamed Amine, déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sous toute forme de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

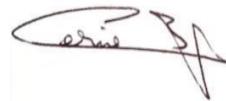
Signature

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bentarzi', with a stylized flourish extending from the end.

Déclaration sur l'honneur

Je soussignée BEN MANSOUR Cerine, déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sous toute forme de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cerine', with a stylized flourish extending to the right.

Dédicace :

A mes parents qui m'ont donné la vie, à ma mère le pilier de mon existence et à mon père qui s'est sacrifié pour ma réussite.

A ma petite sœur NESRINE, la prunelle de mes yeux.

A mes grands-parents paternels : DJAMILA et HASSAN, des êtres que je chérie plus que tout.

A mon grand-père maternel : SAID, ses citations que je considère comme devise. Et à ma défunte grand-mère TAOS, que j'aime sans même avoir connu et qui m'a transmis son amour des animaux.

A tous mes tantes et mes oncles ainsi que leurs familles respectives qui été et qui serons toujours là pour moi.

À ma chère tante Bentarzi Louiza de m'avoir épaulé et de sa présence tout au long de ma démarche à l'institut PASTEUR d'Alger

Je dédie ce travail également à ma binôme CERINE et mes précieux amis : ABDELMALEK, RYAD, OMAR, NABIL, SARAH, AZZEDINE, LYNA, KHALIDA et AMAYAS ainsi que bien D'autres qui ont fait de mon parcours universitaire, la meilleure partie de ma vie que je n'oublierai jamais.

Aux enseignants de l'ENSV qui m'ont fourni les outils à la réussite de ma vie professionnelle.

Amine

Je dédie ce modeste travail à :

A mes chers parents, aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération, et mon amour pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon bien-être, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A ma sœur TSOUMA pour sa présence et son soutien tout au long de mon parcours universitaire.

A mon frère Idir et ma chère cousine Tinhinane.

A mon binôme Amine et tous mes amis et proches AZZEDINE, ADELEN, MERIEM, NABIL, SARAH, AMAYAS, LYNA, RYAD, OMAR et FERIEL, ainsi que bien d'autres qui ont toujours été là pour moi, que je considère comme une deuxième famille.

A toutes les personnes impliquées de façon directe et indirecte dans la lutte contre la rage.

Cerine

Remerciements

Premièrement, nous remercions ALLAH d'être à nos côtés et de nous donner la force pour accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à nos très chers parents d'avoir toujours été là pour nous et de croire en nous.

Nous aimerons aussi remercier nos amis, et toutes autres personnes qui nous à aider par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils, leur critiques et leurs soutiens.

Nous souhaitons exprimer nos remerciements également envers nos encadreurs :

Notre promoteur Mr M. Issad, qui nous a fait découvrir le sujet qui à guider notre mémoire. Pour sa patience, son travail et le temps qu'il nous a consacré.

Notre Co promoteur Mr H. Lahouassa pour ses conseils et orientation.

Mme Belekehal faiza qui était là pour nous et qui nous a apporté énormément d'aide et de soutien.

Nous tenons à remercier les membres du jury :

Mme Marniche qui nous fait l'honneur de présider le jury

Mme Boukhors qui nous fait l'honneur d'examiner notre travail

Un grand merci, à l'équipe de l'institut PASTEUR d'ALGER à KOUBA et DELYBRAHIM

SOMMAIRE

LISTE DES ANNEXES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

ABREVIATION

RESUME

INTRODUCTION **1**

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

GENERALITES SUR LA RAGE **3**

1. Historique de la rage **3**

2. Virus de la rage **5**

2.1 Classification 5

2.2 Structure 6

2.3 Multiplication du virus 7

3 Epidémiologie **10**

3.1 Sources du virus 10

3.2 Cycle sylvatique et urbain 10

3.3 Mode de transmission du virus 11

3.4 Conditions de transmission du virus 12

4 Acheminement du virus dans l'organisme **13**

4.1 Pénétration du virus 13

4.2 Invasion centripète du système nerveux 13

4.3 Diffusion centrifuge à partir du cerveau 14

5 Réponses immunitaires **15**

5.1	Premières lignes de défenses de l'organisme	15
5.2	Immunité innée au niveau du système nerveux	16
5.3	Immunité adaptative	17
5.4	Immunité adaptative au niveau du système nerveux	18
6	Symptômes	20
6.1	Rage furieuse	21
6.2	Rage paralytique (ou muette)	21
7	Diagnostic de la rage	22
7.1	Diagnostic chez les animaux	22
7.2	Diagnostic chez l'être humain	22
7.3	Diagnostic de laboratoire	23
8	Traitement et prévention	26
8.1	Vaccination préventive	26
8.2	Prophylaxie post-exposition	26
	VACCINS ANTIRABIQUES	28
1.	Réponse vaccinale	28
2.	Types de vaccin antirabique	28
2.1	Vaccins antirabiques de première génération	29
2.2	Vaccins antirabiques de deuxième génération	29
2.3	Vaccins antirabiques de troisième génération	32
	PARTIE EXPERIMENTALE	34
	Objectif de l'étude	34
	Matériels	34
1.	Animaux	34
2.	Souche virale utilisée	34
3.	Matériel non biologique	35
	Méthodes	35

1. Préparation de la matière cérébrale	36
2. Préparation du vaccin	39
3. Test de contrôle	41
4. Test de stérilité	42
5. Test d'activité (NIH)	42
Résultats	44
1. Résultat du test d'innocuité	44
2. Résultat du test de virulence initiale	44
3. Résultats du test d'activité résiduelle	47
4. Résultat du test NIH	47
5. Produit fini	51
Discussion	52
CONCLUSION ET PERSPECTIVE	58
ANNEXES	59
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Valeurs numériques pour calculer les titres (facteur de dilution = 10)	59
Annexe 2 : Valeurs numériques pour calculer les titres (facteur de dilution 2 et 5).....	60

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique des membres de l'ordre Mononegavirales (King et al, 2012)	5
Figure 2 : Schéma représentatif du virus rabique en forme de balle de revolver (le schéma du dessus) le génome du virus rabique ARN négatif monobrin (schéma du dessous).....	7
Figure 3 : Cycle de multiplication des Rhabdovirus. La totalité du cycle est intracytoplasmique	8
Figure 4 : Synthèse, glycosylation et transport des spicules viraux (d'après White DO & Fenner FJ. Medical Virology, Academic Press, 1994).....	9
Figure 5 : Vue microscopique des corps de Negri.....	10
Figure 6 : Cycle de transmission de la rage	11
Figure 7 : schéma représentant le cycle de transmission du virus et au sein des mammifères à sang chaud.....	13
Figure 8 : Diagramme montrant les différentes étapes du virus dans l'organisme hôte	14
Figure 9 : Les interactions qui se produisent entre le RABV et l'immunité de l'hôte.....	18
Figure 10 : Phase de la réponse immunitaire adaptative	19
Figure 11 : un chien enragé avec de la salive dégoulinant de la bouche	21
Figure 12 : Corps de Negri ; inclusions cytoplasmiques dans cellules de cerveau de chien, signe de l'infection.....	24
Figure 13 : Micrographie révélant un résultat positif du a la présence d'antigène antirabique avec la technique d'immunofluorescence directe.....	25
Figure 14 : Une représentation schématisée du taux d'anticorps lors de la première injection et à la deuxième injection	28
Figure 15 : Photo de la lignée cellulaire BHK-21	31
Figure 16 : diagramme récapitulatif des étapes de fabrication et des points de contrôles	36
Figure 17 : Les nouveaux nés prêt à être inoculé	37
Figure 18 : Souriceaux euthanasiés par l'éther.....	38
Figure 19 : Matière cérébrale virulente récoltés	38
Figure 20 : LE BPL	40
Figure 21 : Matériel d'extraction de la matière cérébrale	40
Figure 22 : L'inactivation de la matière cérébrale	41
Figure 23 : histogramme 1 des lots à expertiser en fonction de leurs DE50 et la DE50 du vaccin de référence	49

Figure 24 : histogramme 2 des lots à expertiser et celui de référence en fonction de leurs valeurs antigéniques	50
Figure 25 : Le vaccin RAGIVAC ND conditionné et étiqueté produit dans l'Algérois à l'Institut Pasteur (IPA).....	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : la prophylaxie post exposition recommandée selon la catégorie d'exposition (Anonyme 10, 2018).....	27
Tableau 2 : Nombres de mortalité des souris inoculées lors du test de virulence initial avant inactivation par le BPL à partir de différentes dilutions	45
Tableau 3 : Résultats du test de virulence initiale de la matière cérébrale.....	46
Tableau 4 : La Présentation des DE50 et des valeurs antigéniques.....	48

ABREVIATION

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ARN : Acide ribonucléique
- BHK 21 : Baby Hamster Kidney clone 21
- BPL : Béta propriolactone
- CD4+ : Cluster de différenciation 4
- CD8+ : Cluster de différenciation 8
- CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
- CVS : Challenge Virus Standard
- DE50 : Dose efficace à 50%
- DL50 : Dose létale à 50%
- ERIG : Equine Rabies Immunoglobulins
- ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine
- F (ab') : Antigen-binding fragment
- HBV : Hepatitis B virus
- HCV : Hepatitis C virus
- HIV : Human immunodeficiency virus
- HRIG : Human Rabies Immunoglobulins
- ID : Intradermique
- IFN : Interféron
- IG : Immunoglobuline
- IL1 : Interleukine 1
- IL4 : Interleukine 4
- IM : Intramusculaire
- IPA : Institut Pasteur d'Alger
- IRF : Facteur de régulation des interférons
- NK : Natural killer
- NIH : National Institute of Health des états unis
- OIE : Organisation internationale des épizooties
- PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes
- PCS : Plasma collection system

- PI : Post inoculation
- PPE : Prophylaxie post exposition
- PRR : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
- PV : Virus pasteur
- RABV : Virus rabique
- RIG-I: Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors
- RT-PCR: Reverse transcription-polymerasechainreaction
- STAT1: Signal transducer and activator of transcription 1
- SN : Système nerveux
- TCR : Récepteur des cellules T
- Th1: T helper 1
- Th2: T helper 2
- TLR: Toll-like receptors
- TNF: Facteurs de nécrosetumorale
- V-ARN : Virale acide ribonucléique
- Va : Valeur antigénique

Résumé

La rage est une zoonose mortelle et progressive, responsable d'environ 59 000 décès humains causés par le virus de la rage du genre *Lyssavirus* et de la famille des Rhabdoviridae. Elle affecte tous les animaux à sang chaud. C'est une maladie cosmopolite et endémique, essentiellement dans les pays en voie de développement tel l'Algérie. Le nombre de décès en Algérie causé par le virus de la rage est resté stable au cours des dernières années. Des mesures alternatives devraient être envisagées pour atténuer l'impact de la rage sur la santé humaine, telles que des vaccins moins chers et plus immunogènes. L'institut PASTEUR d'ALGERIE est le seul producteur de vaccin antirabique en Algérie. Il produit un vaccin à base de cerveau de souris inactivé par la bêta propriolactone. Nous nous sommes intéressés de plus près à cette fabrication pour mieux comprendre ce processus ainsi que les moyens de contrôle tel que le test de virulence et le test NIH qui font l'objet de notre étude.

Mot clés : pasteur -rage- immunité-vaccin-souris-contrôle

Abstract:

Rabies is a fatal and progressive zoonosis responsible for approximately 59,000 human deaths caused by the rabies virus of the genus *Lyssavirus* and the family Rhabdoviridae. It affects all warm-blooded animals and is a cosmopolitan and endemic disease, mainly in developing countries like Algeria. The number of deaths from the rabies virus in Algeria has remained stable in recent years. Alternative measures should be considered to mitigate the impact of rabies on human health, such as cheaper and more immunogenic vaccines. The PASTEUR Institute of Algeria is the only producer of rabies vaccine in Algeria. It produces a vaccine based on the brains of baby mice inactivated by beta propriolactone. We took a closer look at this production for a better understanding of the process as well as the means of control such as the virulence test and the NIH test that are the subject of our study.

Keywords: Pasteur -rabies- immunity-vaccine-mice-control

ملخص

داء الكلب هو مرض حيواني المنشأ قاتل ومتطور مسؤول عن حوالي 59000 حالة وفاة بشرية ناجمة عن فيروس داء الكلب من جنس . إنه يصيب جميع الحيوانات ذوات الدم الحار وهو مرض عالمي ومتوطن، خاصة في البلدان النامية مثل الجزائر. ظل عدد الوفيات بفيروس داء الكلب في الجزائر Lyssavirus وعائلة Rhabdoviridae مستقرا في السنوات الأخيرة. ينبغي النظر في التدابير البديلة للتخفيف من تأثير داء الكلب على صحة الإنسان، مثل اللقاحات الأرخص تكلفة وأكثر استمالة للمناعة. معهد باستير بالجزائر هو المنتج الوحيد للقاح داء الكلب في الجزائر. إنه ينتج لقاحا يعتمد على أدمغة الفئران الصغيرة المعطلة بواسطة بيتا بروبيريوكتون.

لقد ألقينا نظرة فاحصة على هذا الإنتاج من أجل فهم أفضل للعملية وكذلك وسائل التحكم مثل اختبار الفوعة واختبار المعاهد الوطنية للصحة التي هي موضوع دراستنا.

الكلمات المفتاحية: باستور - داء الكلب - مناعة - لقاح - فئران-مراقب

INTRODUCTION

La rage est une zoonose virale responsable d'environ 59 000 décès humains par an et cela depuis 3,7 millions d'années de vie. (HAMPSON, K. *et al.* 2015)

La rage est presque toujours mortelle une fois les signes cliniques apparus, à la suite d'une encéphalite aiguë évolutive. La rage touche principalement les populations desservies, tant rurales qu'urbaines, et elle est documentée depuis plus de 4000 ans (TARANTOLA, A. 2017).

La plupart des cas surviennent en Afrique et en Asie, et environ 40% sont des enfants âgés de <15 ans. Tous les mammifères sont sensibles à l'infection par le virus rabique. La transmission de ce virus par les chiens est responsable de 99% des cas de rage humaine dans les régions où cette maladie est endémique, une petite proportion étant due à la transmission par des animaux sauvages (tels que le renard, le loup, le chacal, la chauve-souris, le raton laveur, la mouffette ou la mangouste) (WHO FACTSHEET ON RABIES ,2018).

Les campagnes de vaccination de masse ciblant les chiens constituent la principale stratégie de lutte contre la rage, interrompant la transmission du virus rabique entre les chiens et réduisant la transmission à l'homme et aux autres mammifères. Cette stratégie a été efficace dans différents contextes en Afrique, en Asie, en Europe et dans les Amériques. À mesure que l'incidence de la rage à médiation canine diminue grâce à des programmes de lutte efficaces, la rage provenant d'autres sources, bien que rare, devient plus importante, comme on l'observe actuellement dans les Amériques. Les espèces sauvages de carnivores et les chauves-souris (Carnivora et Chiroptera) représentent un risque plus élevé de transmission du virus rabique que les autres espèces sauvages, car elles constituent des réservoirs pour ce virus. (BIRHANE, MG *et al.*, 2017)

La transmission interhumaine de la rage n'a jamais été confirmée, sauf très rarement à la suite d'une greffe de tissus et d'organes infectés. (RUPPRETCH, CE *et al.*, 2016)

L'analyse des données du bulletin annuel d'épidémiologie de l'Institut algérien de santé publique de 2010 à 2017 a révélé que les humains meurent de la rage à un taux de 15 à 20 décès par an, avec une moyenne annuelle de 18 décès. L'analyse des données a également révélé une recrudescence significative des cas de prophylaxie post-exposition (PPE), de 97 321 en 2010 à 121 545 en 2017. Le gouvernement algérien couvre les frais de traitement par PPE, donc l'augmentation rapportée des cas de PPE constitue un fardeau énorme pour le

budget du gouvernement. Les morsures de chien en Algérie se sont avérées être la source de cas de PPE (KARDJADJ, BEN-MAHDI 2019).

L'objectif de ce projet de fin d'étude est de mettre en avance les travaux de l'IPA concernant la lutte contre la rage avec toute transparence, une maladie que tout Algérien doit connaître et en cas d'exposition les moyens de prophylaxie devraient être disponible. Notre étude est composée d'une partie bibliographique rappelant le tableau clinique et épidémiologique du virus rabique. De plus, une étude expérimentale qui décrit le processus de fabrications du vaccin à l'IPA.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans ce chapitre nous allons aborder l'histoire de l'agent causal de la rage ainsi que sa structure, transmission, développement à l'intérieure de l'organisme, les manifestations cliniques et les biotechnologies qui peuvent nous permettre de diagnostiquer cette maladie et la prévenir grâce à des vaccins antirabiques, ces derniers ont évolué à travers le temps et se présentent sous formes de trois générations avec diverses avantages et inconvénients.

Généralités sur la rage

1. Historique de la rage

La rage est une maladie connue depuis la plus haute antiquité. C'est surtout à partir du 19^{ème} siècle que les progrès ont été observés en matière d'approche expérimentale de la maladie et de traitement après que les contaminations ont débutées. A cette même période, la rage connaissait une extension spectaculaire sur tous les continents (COLLARD, 2006. CHAIX, 2009).

Premières recherches méthodiques :

En 1804, Zincke montre que le virus présent dans la salive d'animaux enragés peut être transmis au lapin et au chien en souillant de bave les plaies cutanées (AUBRY, P et ROTVEL, Y 2001).

En 1821, Magendie et Breschet, inoculent la salive d'un malade atteint de la rage à un chien, sous la peau du front. L'animal devient enragé au bout d'un mois, il mord deux autres chiens, qui deviennent enragés à leur tour après 40 jours (AUBRY, P et ROTVEL, Y 2001).

En 1879, Duboué suggère qu'après la morsure infectante, le virus rabique suit le trajet des nerfs pour atteindre le système nerveux central. Dans la même année, Pierre Victor Galtier, Professeur à l'Ecole vétérinaire de Lyon, transmet la maladie au lapin par injection de salive de chien enragé et immunise des moutons par injection intraveineuse de virus rabique (AUBRY, P et ROTVEL, Y 2001).

En 1881, l'équipe de Louis Pasteur (1822-1895) montre que le principal site de réplication du virus rabique est le système nerveux central et qu'il est plus facile de transmettre la rage par inoculation intracérébrale de substances virulentes (broyat de cerveau d'animaux enragés). Ces découvertes lui permettent, en réalisant plusieurs passages en série du virus par inoculation intracérébrale sur le lapin, d'obtenir une souche virale fixe qui après atténuation

par dessiccation sera utilisée en 1884 dans la mise au point d'un protocole d'immunisation sur des chiens (AUBRY, P et ROTVEL, Y 2001).

Le 6 juillet 1885, les deux médecins Grancher et Vulpian vaccinent sous la direction de Pasteur, pour la première fois un enfant de 9 ans, Joseph Meister, qui a reçu 14 morsures d'un chien enragé, toutes potentiellement mortelles et l'enfant est sauvé. Pasteur écrit « Joseph Meister a donc échappé, non seulement à la rage que ses morsures auraient pu développer, mais à celle que je lui ai inoculée pour contrôle de l'immunité due au traitement (AUBRY, P et ROTVEL, Y 2001).

Trois mois plus tard, Pasteur obtient de nouveau un succès en vaccinant Jean Baptiste Jupille, un jeune berger mordu 4 jours auparavant par un chien enragé. Les succès de Pasteur sont médiatisés et dès fin 1885, des patients viennent d'aussi loin que Newark dans le New Jersey pour se faire soigner. Fin 1885, sur 100 patients traités après Joseph Meister, seulement deux échecs sont à déplorer, durant la même période Loir et Viala, deux collaborateurs de Pasteur qui travaillent sur la rage, sont les premiers à recevoir une vaccination avant exposition (BOURHY et *al*, 2013).

Un an plus tard, sur 1726 inoculations de Pasteur contre la rage, on ne comptait que 10 échecs. L'Académie des Sciences décide alors la création de l'Institut Pasteur, qui ouvre ses portes en 1888(AUBRY et *al*, Y 2001).

Des progrès sont accomplis dans la première moitié du XXème siècle. En 1903 Negri décrit des inclusions caractéristiques de la rage : les corps de Negri dont la valeur diagnostique est montré en 1913 par son épouse Lina Negri-Luzzani, ils seront à la base du diagnostic de la rage jusqu'en 1958 (AUBRY et *al*, Y 2001).

Fermi (1908) et Semple (1911) mettent au point des vaccins à partir du vaccin de Pasteur, qui sont tous encéphalitogène, cause d'accidents neurologiques dus à la présence de myéline et d'impuretés (AUBRY et *al*, Y 2001).

Il faut attendre la seconde moitié du XXème siècle pour que des progrès considérables en vaccinologie et en virologie soient accomplis (AUBRY et *al*, Y 2001) :

-En 1955, Fuenzalida et Palacios : mise au point d'un vaccin préparé à partir de cerveaux de souriceaux nouveau-nés, contenant peu de myéline donc moins encéphalitogène.

-En 1958 : utilisation de l'immunofluorescence directe comme technique de diagnostic.

-En 1962, Matsumoto : mise en évidence du virus par microscopie électronique.

-En 1978 : mise au point de vaccins purifiés préparés en culture cellulaire, identification des diverses souches de virus rabique et des virus apparentés par les anticorps monoclonaux et utilisation de cultures cellulaire comme technique de diagnostic.

-En 1986 : étude de la structure et du patrimoine génétique du virus par biologie moléculaire.

-En 1991 : amplification génique (RT-PCR).

2. Virus de la rage

La rage est une maladie virale infectieuse, inoculable considéré comme une zoonose majeure.

2.1 Classification

L'ordre des Mononégavirales.

La famille des Rhabdoviridae (du grec rhabdos, baguette, d'après la forme "rectangulaire" du virion)

Genre *Lyssavirus* (lyssa de la racine lud : violent et folie) (SUREAU, P. s. d.).

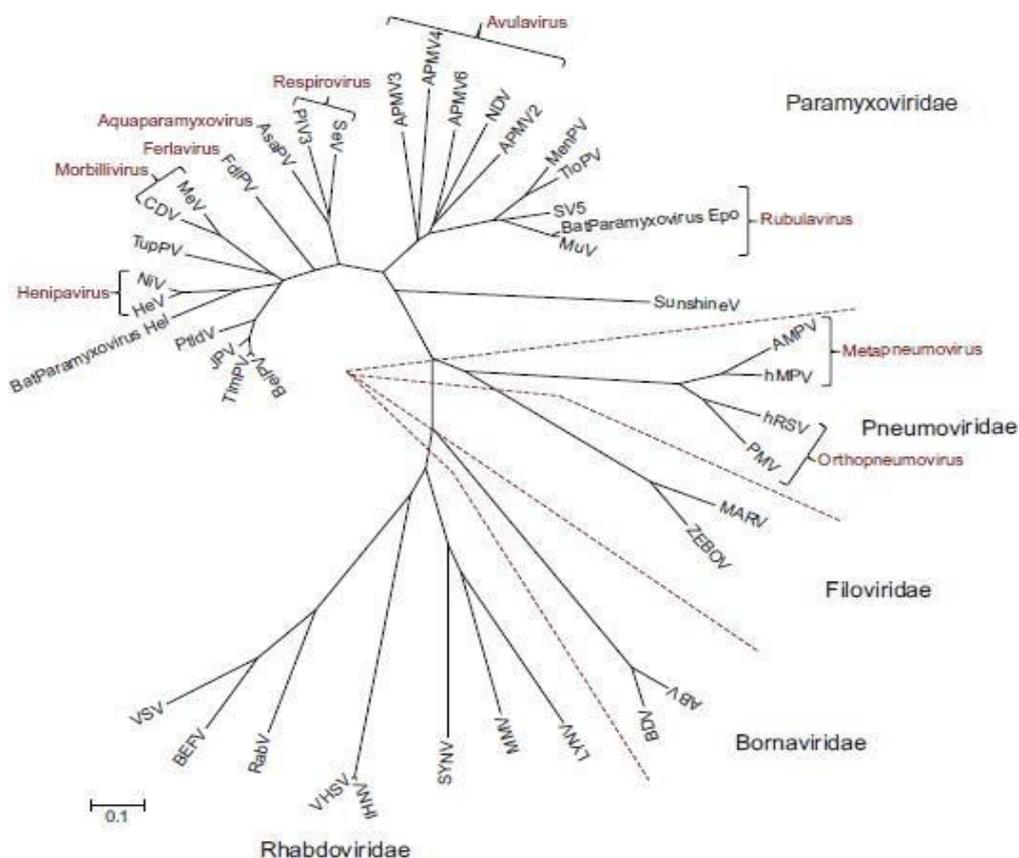


Figure 1 : arbre phylogénétique des membres de l'ordre Mononegavirales (KING et al, 2012)

2.2 Structure

Le virus se présente sous la forme d'un bâtonnet, Il mesure en moyenne 75 nm de diamètre pour une longueur variant de 130 à 300 nm, Avec une extrémité plate et l'autre arrondie, lui conférant un aspect en "balle de revolver" tout à fait caractéristique, il existe deux autres formes : filamenteuse et ronde. C'est un virus enveloppé avec une nucléocapside à symétrie hélicoïdale (PR. DECOSTER, A. et *al. s. d.*).

La nucléocapside est constituée du :

- Génome : ARN de polarité négative, non segmenté. De l'extrémité 3' vers l'extrémité 5', le génome viral (d'environ 12 kb) comprend successivement une séquence leader non codante d'environ 70 bases, cinq gènes codant les cinq protéines virales (la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P, la protéine matrice M, la glycoprotéine G et l'ARN polymérase ARN dépendante L) et enfin une séquence traileroncodante d'environ 100 bases. Les différents gènes sont bordés de courtes séquences conservées de dix nucléotides servant de signal de début et de fin de transcription (BOURHY *et al* 2013).
- La capsid : La capsid résulte de l'assemblage d'environ 2000 molécules de protéine N autour du génome, formant une nucléocapside de symétrie hélicoïdale qui prend l'allure d'un ressort condensé dans l'axe du virus (PR. DECOSTER, A. et *al. s. d.*).

Une cinquantaine de molécules du complexe Polymérase (ARN-polymérase L et cofacteur P) sont associées à la nucléocapside (PR. DECOSTER, A. et *al. s. d.*).

L'enveloppe recouvre la nucléocapside, elle est constituée :

- La glycoprotéine G : Dans la double couche lipidique, d'origine cellulaire, sont insérées les spicules (trimères de la glycoprotéine G), assurant la fixation du virus aux récepteurs cellulaires. La glycoprotéine G induit des anticorps protecteurs car ils empêchent la fixation des virions aux récepteurs cellulaires.
- La protéine matrice M : la protéine M forme une couche qui tapisse la face interne de l'enveloppe. Elle intervient dans l'assemblage du virion en réunissant les spicules et en condensant la nucléocapside en hélice.

- Le brin génomique d'ARN - et la protéine N qui le recouvre forment une nucléocapside hélicoïdale condensée en un ressort d'une quarantaine de spires et à laquelle plusieurs molécules L et P sont associées.

La face interne de l'enveloppe est tapissée par la matrice (protéine M).

La glycoprotéine G est insérée dans l'enveloppe sous forme de trimères (spicules) responsables de l'attachement et de la fusion (PR. DECOSTER, A. et *al.* s. d.).

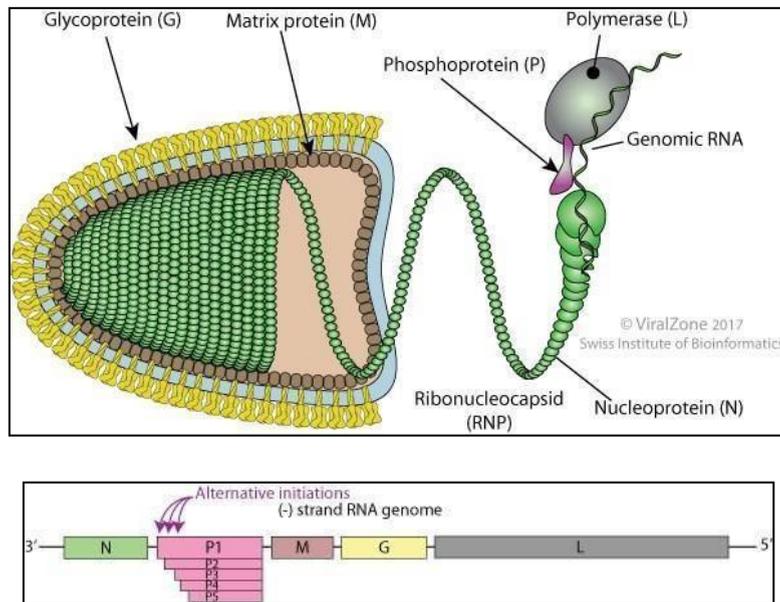


Figure 2 : Schéma représentatif du virus rabique en forme de balle de révolver (le schéma du dessus) le génome du virus rabique ARN négatif monobrin (schéma du dessous) (LYSSA VIRUS VIRAL ZONE PAGE.s.d.).

2.3 Multiplication du virus

Le virus de la rage nécessite une cellule hôte pour se multiplier et se propager.

La séquence d'événements de réplication du virus de la rage *in vivo* peut être divisée en trois phases. La première phase, ou la phase précoce, comprend la fixation du virus aux récepteurs des cellules hôtes sensibles, et l'entrée par fusion directe du virus. La deuxième phase comprend la transcription et la réplication du génome viral, et la troisième phase, ou phase tardive, comprend l'assemblage du virus et la sortie de la cellule infectée (ALAN C. JACKSON 2011).

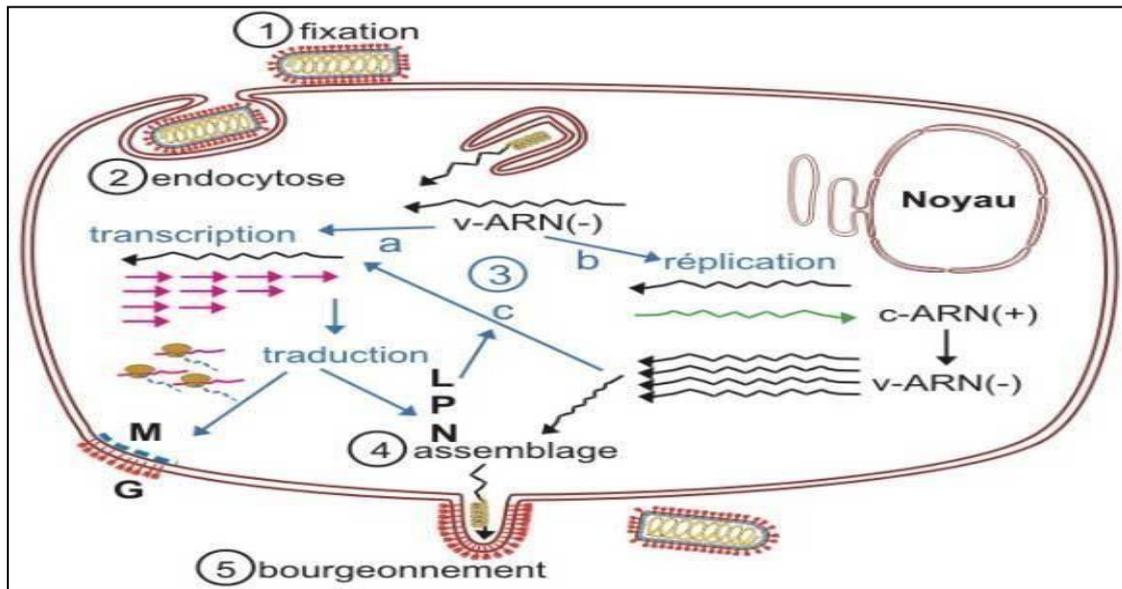


Figure 3 : cycle de multiplication des Rhabdovirus. La totalité du cycle est intra cytoplasmique (RHABDOVIRIDAE, s. d.)

- Fixation :

Les spicules (trimères de G) se fixent aux récepteurs cellulaires. Les récepteurs doivent être présents sur les nombreux types cellulaires sensibles à l'infection : tissus musculaire, nerveux, cutané, glandulaire (glandes salivaires, foie, reins). Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine serait important pour l'infection des cellules musculaires et des neurones par le virus rabique (PR. DECOSTER, A. et *al.* s. d.).

- Pénétration :

Le virion est endocyté par la cellule, ensuite l'acidification de l'endosome modifie la conformation de la glycoprotéine G qui acquiert des propriétés fusogéniques ; l'enveloppe fusionne avec la membrane de l'endosome et la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme (PR. DECOSTER, A. et *al.* s. d.).

Phase des synthèses virales :

L'expression du génome débute par la transcription de l'ARN viral (le v-ARN) en ARN messagers qui sont traduits en protéines, la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme active les complexes de transcription [P + L]. La protéine P, en reconnaissant le promoteur unique situé au début du génome, favorise le positionnement de la protéine L. cette dernière, exerce 3 activités enzymatiques :

- ✓ ARN polymérase ARN dépendante : exerçant les deux activités transcriptase / répliquase,
- ✓ Méthylase : pour la coiffe des ARN-messagers,
- ✓ Poly A polymérase : pour la queue des ARN-messagers

- Réplication du génome :

Elle se fait par la synthèse des matrices d'ARN+ (l'anti génome). Puis la synthèse de nouveaux génomes (v-ARN) à partir de ces matrices.

- La transcription secondaire :

Les nouveaux génomes sont transcrits en ARN messagers qui sont traduits en protéines de structure.

- L'assemblage :

Des vésicules transportent les spicules vers la région baso-latérale de la membrane cytoplasmique avec laquelle elles fusionnent (PR. DECOSTER, A. et *al.* s. d.).

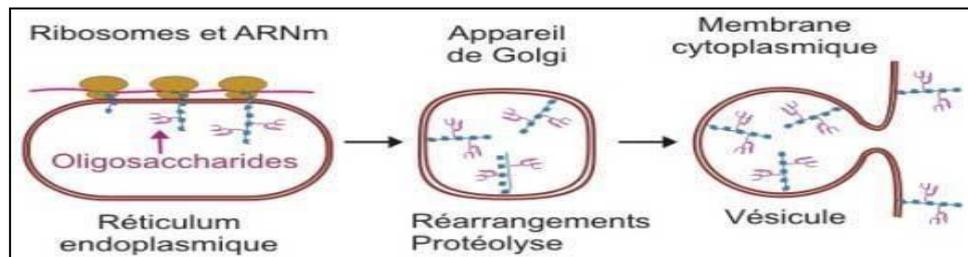


Figure 4 : Synthèse, glycosylation et transport des spicules viraux (d'après White DO & Fenner FJ. Medical Virology, Academic Press, 1994) (RHABDOVIRIDAE, s. d.).

La protéine M se dépose sur la face interne de la membrane cytoplasmique. Elle interagit avec l'extrémité des spicules qu'elle rassemble avec les nucléocapsides dont elle assure la condensation sous la forme hélicoïdale caractéristique. Les nucléocapsides et virions s'accumulent dans une matrice fibreuse et forment des inclusions pathognomoniques et caractéristiques observables au microscope optique : les corps de Negri (du nom du médecin italien, Adelchi Negri, qui a décrit cette lésion en 1903) (PR. DECOSTER, A. et *al.* s. d.).

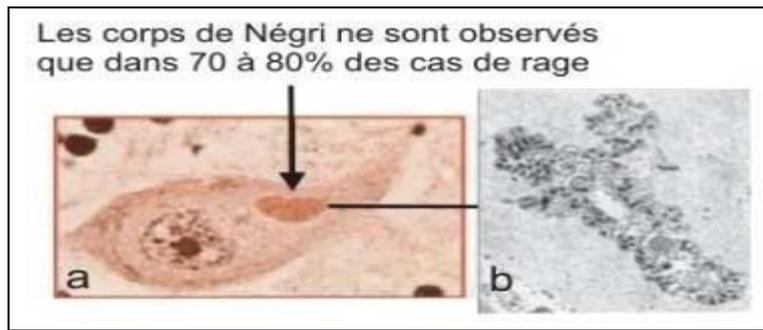


Figure 5 : Vue microscopique des corps de Negri (RHABDOVIRIDAE, s. d.)

- Libération

On peut observer soit un bourgeonnement externe des particules virales, à partir de la membrane cytoplasmique, soit un bourgeonnement interne à partir des membranes du réticulum et de l'appareil de Golgi (où a eu lieu la synthèse et la glycosylation de la protéine d'enveloppe G). Dans ce cas, les virions sont transportés dans des vésicules qui fusionnent avec la membrane cytoplasmique (PR. DECOSTER, A. et *al.* s. d.).

3 Epidémiologie

3.1 Sources du virus

La salive et les tissus cérébraux constituent la principale source de virus.

3.2 Cycle sylvatique et urbain

Il existe deux cycles de la rage qui sont l'urbain et le sylvatique.

Les principaux réservoirs de la rage urbaine sont les chiens. La rage sylvatique, ou rage des animaux sauvages, coexiste vraisemblablement avec la rage canine. Les chiens errants sont les intermédiaires entre la rage sauvage et la rage urbaine, ils transmettent la rage à d'autres animaux sauvages, aux herbivores et aux carnivores domestiques non vaccinés (chiens, chats) (AUBRY, P et ROTIVEL, Y 2001).

Parallèlement à la rage des carnivores terrestres coexiste un cycle de la rage des chiroptères. On distingue la rage des chauves-souris hémato-phages ou vampires, qui n'existent qu'en Amérique centrale et du Sud, la rage des chauves-souris insectivores est de répartition mondiale et celle des chauves-souris frugivores des régions tropicales. (AUBRY et *al.*, 2001).

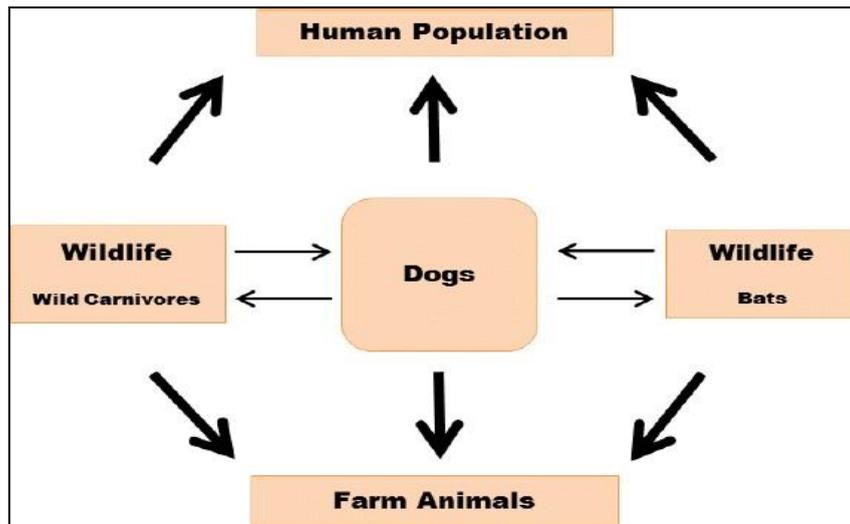


Figure 6 : Cycle de transmission de la rage (RHABDOVIRIDAE, s. d.).

3.3 Mode de transmission du virus

Le virus de la rage se transmet par contact direct (comme par exemple à travers une peau lésée ou des muqueuses des yeux, du nez ou de la bouche) avec la salive ou les tissus du cerveau / du système nerveux d'un animal infecté. Les gens contractent généralement la rage après avoir été mordu par un animal enragé. Il est également possible, mais rare, que des personnes contractent la rage par d'autres lésions, ce qui peut inclure des égratignures, des écorchures ou des plaies ouvertes exposées à la salive ou à d'autres matières potentiellement infectieuses provenant d'un animal enragé. D'autres types de contact, tels que caresser un animal enragé ou avec le sang, l'urine ou les matières fécales d'un animal enragé, ne sont pas associés à un risque d'infection et ne sont pas considérés comme des expositions préoccupantes pour la rage (NCEZID, s. d.).

Les autres modes de transmission, à part les morsures et les égratignures, sont rares. L'inhalation du virus de la rage en aérosol est une voie d'exposition potentielle, mais à l'exception des travailleurs de laboratoire, la plupart des gens ne rencontreront pas un aérosol du virus de la rage (, NCEZID, s. d.).

Un contact occasionnel, comme toucher une personne atteinte de la rage ou un contact avec un liquide ou un tissu non infectieux (urine, sang, selles), n'est pas associé à un risque d'infection. Le contact avec une personne qui reçoit un vaccin antirabique ne constitue pas

une exposition à la rage, ne présente pas de risque d'infection et ne nécessite pas de prophylaxie post-exposition, NCEZID, s. d.

Le virus de la rage devient non infectieux lorsqu'il se dessèche et lorsqu'il est exposé au soleil. Différentes conditions environnementales affectent la vitesse à laquelle le virus devient inactif, mais en général, si le matériel contenant le virus est sec, le virus peut être considéré comme non infectieux (NCEZID, s. d.)

3.4 Conditions de transmission du virus

Tous les animaux à sang chaud peuvent être contaminés. Les mammifères tels que le chat, le raton laveur, le renard, la chauve-souris, la vache et surtout le chien sont les plus sensibles. Avant d'infecter l'homme, le virus rabique est généralement présent chez les animaux sauvages puis domestiques. Le virus est déjà présent dans la salive de l'animal avant l'apparition des premiers symptômes. Généralement, cette période dite d'incubation est très variable, elle peut aller de quelques jours à un ou deux mois et même jusqu'à un an chez les ratons laveurs(TPE LA RAGE s. d.).

Ce sont les animaux sauvages qui sont les réservoirs mais aussi les vecteurs premiers. Certaines saisons sont plus propices que d'autres à la contamination et la transmission du virus chez les animaux sauvages. En effet, le printemps et l'automne sont les deux périodes où le risque que la rage soit transmise à d'autres vecteurs et/ou réservoirs est le plus élevé. Le printemps s'explique par le fait que les animaux sortent de leurs terriers où ils ont passé tout l'hiver en groupe. S'il y a contamination d'un animal, le risque que le reste de la meute devienne également contaminé est donc beaucoup plus élevé car ceux-ci vivent en grand nombre pendant plusieurs mois. En automne, les petits quittent leur mère, il y a donc une propagation des risques plus importante, le nombre de cas ne se multiplie pas mais il y a une dispersion des animaux. Ces animaux sauvages peuvent transmettre ensuite la maladie à d'autres vecteurs (TPE LA RAGE s. d.) :

Soit à des animaux domestiques (chiens, chats) qui sont donc en contact avec l'homme. Les conditions de transmission du virus sont alors multiples et pour la plupart directe. Soit aux herbivores comme les bovins. Ces ruminants peuvent être en contact avec l'homme et ne mordent pas. Cependant, un fermier peut être contaminé par une de ses vaches lors d'un léchage à cause de coupures au niveau de ses mains (TPE LA RAGE s. d.).

L'homme peut alors être qualifié de “cul-de-sac” de la maladie : il ne transmet plus la maladie (aucun cas recensé de morsure d'homme à homme), la chaîne d'infection s'arrête. La transmission du virus d'homme à homme peut être cependant possible lors d'une greffe d'organe d'un individu atteint de la rage par exemple. Des cas extrêmement rares ont été recensés, par exemple aux Etats-Unis. Un patient est décédé un an après une transplantation d'organe. Après de multiples analyses chez le donneur et le receveur, il s'est avéré que le donneur était atteint de la rage après avoir été mordu par un raton laveur. Ces cas peuvent être possibles car la rage n'est pas dépistée chez les donneurs d'organes étant donné la rareté de cette maladie (TPE LA RAGE s. d.).

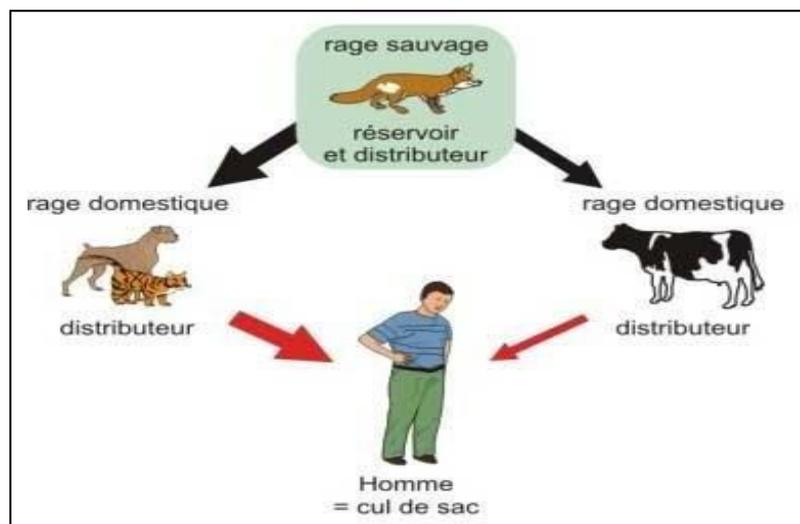


Figure 7 : schéma représentant le cycle de transmission du virus et au sein des mammifères à sang chaud (RHABDOVIRIDAE, s. d.).

4 Acheminement du virus dans l'organisme

4.1 Pénétration du virus

Le virus de la rage est le plus souvent inoculé à son hôte lors de la morsure par un animal contaminé. Il se multiplie d'abord dans les cellules musculaires. Il pénètre dans le système nerveux par endocytose au niveau des terminaisons nerveuses libres et des jonctions neuromusculaires (PR. DECOSTER .A et *al.* s. d.).

4.2 Invasion centripète du système nerveux

Les virions sont transportés dans l'axone vers le corps cellulaire où le virus se multiplie. Les virions qui bourgeonnent du neurone infecté, sont libérés dans l'espace inter synaptique et

infectent le neurone post-synaptique suivant. Le virus parvient au cerveau où il continue sa réplication. La maturation des nouveaux virions peut avoir lieu à la surface de la cellule et à l'intérieur du cytoplasme (PR. DECOSTER, A. et *al.* s. d.).

4.3 Diffusion centrifuge à partir du cerveau

Le virus se dissémine ensuite dans tous les tissus par voie centrifuge, infectant les glandes salivaires mais aussi l'œil, les follicules pileux, le pancréas et les reins (PR. DECOSTER, A.etal.s.d.).

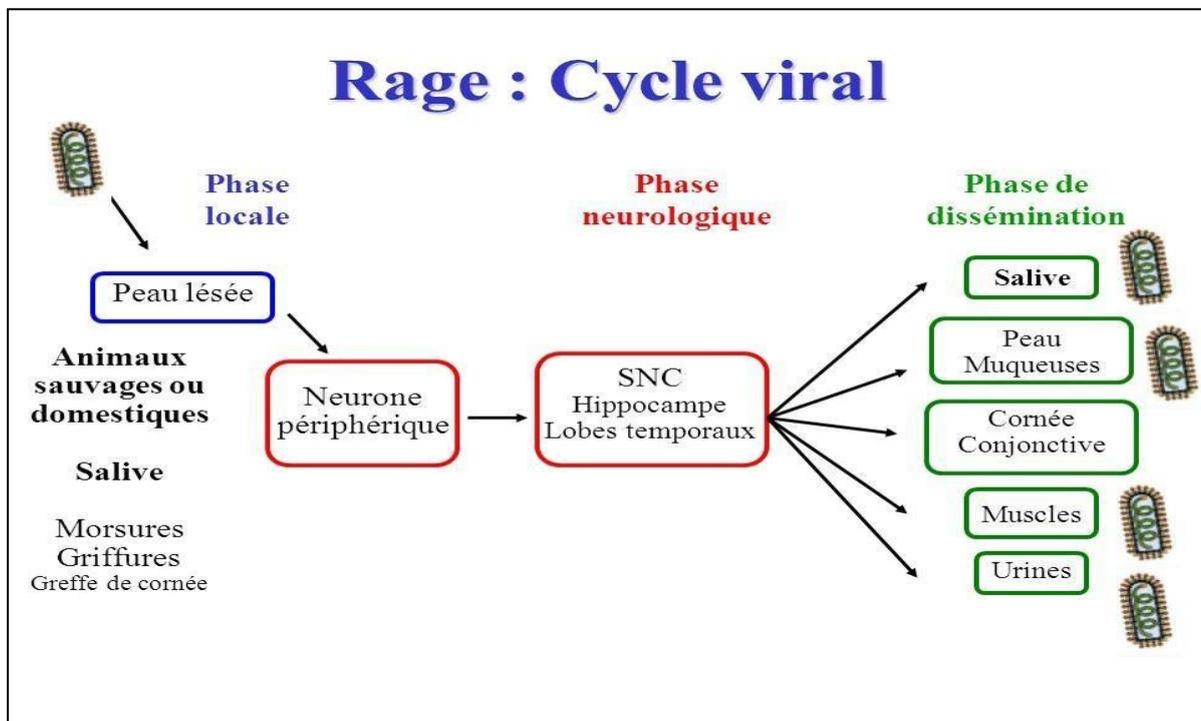


Figure 8 : Diagramme montrant les différentes étapes du virus dans l'organisme hôte (ADAMDANIEL, 2011).

5 Réponses immunitaires

5.1 Premières lignes de défenses de l'organisme

De façon général la réponse immunitaire est commune peu importe le microbe tout comme elle peut être unique à un agent pathogène en particulier. Comment les réactions de l'immunité adaptative réagissent, s'organisent et sont contrôlées est une question fondamentale en immunologie. Mais tout d'abord c'est l'immunité innée qui rentre en jeu (ABBAS, L, et PILLA, 2016).

Le système immunitaire inné bloque l'entrée, élimine et limite la prolifération de beaucoup de pathogènes. Les sites principaux d'interaction individu-environnement sont : la peau, le tractus génital, respiratoire et gastro-intestinale. Si cette barrière physique faillit à son rôle, la pénétration du microbe fait face aux cellules de l'immunité innée qui sont capables de provoquer deux types de réaction (ABBAS, L, et PILLA, 2016) :

Une inflammation : Processus de recrutement de leucocytes et de protéine plasmatique à partir du sang qui consiste à leur accumulation dans le site d'attaque et la destruction des microbes. Les principaux acteurs sont les cytokines produites par les cellules dendritiques, macrophages et autres cellules. Les leucocytes impliqués sont : les phagocytes, neutrophile (durée de vie dans les tissus très courtes) monocytes (qui se transforme en macrophages) qui ont le rôle de destruction des microbes et des cellules mortes (ABBAS, L, et PILLA, 2016).

Défense antivirale : agit de deux façons, soit en rendant les cellules résistantes à la pénétration virale ou bien par la destruction des cellules affectées par les cellules NK (ABBAS, L, et PILLA, 2016).

Si le microbe arrive à passer la circulation sanguine plusieurs protéines plasmatiques peuvent le reconnaître, le plus important est le système du complément (ABBAS, L, et PILLA, 2016).

Concernant la rage, Les différentes voies de pénétration du virus sont multiples et cela conditionne la pathogénie du virus et la réponse immunitaire du corps, plusieurs ont démontré que la souche est déterminante concernant la pathogénie et l'immunité. Cela a pour preuve directe que le virus rabique est capable de stimuler, supprimer et voir s'évader de l'immunité de l'hôte infecté (JACKSON, 2013).

Lors d'exposition par une souche sauvage, une réplication virale dans les tissus voisins fut remarquer (tendon muscle et tissus conjonctif avoisinant), chose qui n'est pas présente lors d'infection par la souche fixe, le virus est directement détecté dans les nerfs périphériques et dans les ganglions trijumeaux à 18h PI (JACKSON, 2013).

Le RABV est vite détecté par les premières lignes de défense au niveau de la peau ou du muscle (site d'inoculation) la réponse immunitaire innée inclus les mécanismes suivants : les IFN de type 1 alpha et bêta, cytokines inflammatoire et chimiokines, l'activation du complément et l'attraction des macrophages neutrophiles et cellules NK dans le site d'infection. Cette immunité non spécifique qui est déclenché quelques heures après inoculation, contrairement à l'immunité adaptative qui est spécifique et a besoin de plusieurs jours pour s'installer. Grace à des récepteurs les premières lignes de défense sont capable de reconnaître l'agent pathogène qu'on appel : les PRR qui sont capable de détecter les PAMP exprimé par les agents pathogènes. Parmi les PRR : les TLR, RIG ...etc. Ils sont présents à plusieurs niveaux dans la cellule (cytosol) ou à sa surface (Membrane plasmique) ces récepteurs restent plus au moins spécifiques car ils ne peuvent détecter qu'un nombre réduit de PAMP. Le RABV qui est un virus (parasite intracellulaire obligatoire) est détecté par le RIG1 qui est dans le cytosol capable de se lier à l'ARN viral (JACKSON, 2013).

5.2 Immunité innée au niveau du système nerveux

Les neurones peuvent aussi répondre et secréter l'inférons de type 1 (prédominance de l'IFN beta, pas d'IFN alpha et pas d'IFN de type 3 lambda) (JACKSON,2013).

Les protéines N et P du RABV sont multifonctionnelles. Elles rentrent dans la synthèse virale et s'oppose à l'immunité innée de l'hôte. La protéine N limite la signalisation au RIG1 et la protéine P supprime la phosphorylation qui suit la signalisation au PRR (Inhibe IRF 3 et7 et supprime la translocation nucléaire de STAT1). Ça conduira à une baisse de sécrétion d'IFN beta par la cellule nerveuse infectée (JACKSON, 2013).

Une réponse inflammatoire consiste à la production de médiateur pro inflammatoire qui peuvent avoir des répercussions dramatiques au niveau du SN causant des dysfonctionnements voire la mort neuronale. L'infection rabique provoque la sécrétion de chimiokines et de cytokines inflammatoires quoique ces marqueurs sont vite régulés au niveau de la moelle épinière et plus tardivement au niveau du cerveau (JACKSON, 2013).

Les TNF alpha et IL1 sont exprimés par les cellules gliales et l'endothélium vasculaire. Le virus déclenche une inflammation limitée qui est inversement proportionnel à sa pathogénicité (JACKSON, 2013).

L'infection à RABV stimule l'expression des chimiokines et des cytokines inflammatoires sauf que ces marqueurs inflammatoires sont vite régulés négativement au niveau de la moelle épinière et juste après au niveau de l'encéphale. La sécrétion de ces marqueurs ne se fait pas par les neurones infectés, mais par les cellules voisines gliales et endothéliales (JACKSON, 2013).

La présence des chimiokines et cytokines est observée plus lors de forme paralytique que dans la forme furieuse ou elles ont vite baissé. L'inflammation étant un facteur clé dans la limite de l'infection rabique. Ce dernier n'est pas le seul à vouloir limiter l'inflammation, le système nerveux lui aussi possède certains mécanismes de régulation de l'inflammation provoquée par le virus. Le but de cette régulation est d'éviter l'apoptose des neurocytes (JACKSON, 2013).

Pour résumer, l'inflammation au niveau du système nerveux est limitée par la réduction de l'entrée des leucocytes mononucléaires et macrophages, au maintien de l'imperméabilité de la barrière hématoencéphalique et surtout minimiser la sécrétion des molécules neurotoxiques afin de ne pas compromettre l'intégrité de la cellule nerveuse qui représente la cellule hôte du virus (JACKSON, 2013).

5.3 Immunité adaptative

La réponse immunitaire adaptative contre un virus neurotrope qui pénètre rapidement dans les voies nerveuses après son inoculation dans le muscle, se produit toujours en périphérie et jamais dans le système nerveux, qui est dépourvu d'organes lymphoïdes. Le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative a lieu dans les organes lymphoïdes ; tels que les ganglions lymphatiques ou la rate qui dépendent de l'activation des cellules présentatrices d'antigènes. Les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent les antigènes étrangers qui ont été traité par la voie de présentation exogène du CMH de classe II par les cellules dendritiques activées. Une fois présentée par le CMH, les peptides issus de l'antigène étranger phagocyté est reconnu par les cellules T qui porte le récepteur approprié (TCR) et molécule CD4. La signalisation via la molécule TCR et CD4 déclenche l'activation et la différenciation des cellules T en deux sous-ensembles, les cellules T helper 1 (Th1) et T helper 2 (Th2). La distinction des deux sous-ensembles, qui sont plus clairs chez la souris que chez le système

Immunitaire humain, est basée sur les cytokines qu'ils sécrètent : l'interféron-gamma est la signature des cellules Th1, tandis que l'interleukine-4 (IL-4) est la signature des cellules Th2. La génération des cellules Th1 est sous le contrôle de l'IL-12 produite par les macrophages et les cellules dendritiques. Les cellules Th1 limitent la prolifération d'agents pathogènes via la production d'IFN-gamma et apporte de l'aide pour la production d'anticorps par les lymphocytes B. Cellules T CD8 +, contrairement aux lymphocytes T CD4 +, reconnaissent les antigènes étrangers qui ont été traités par la voie endogène des cellules exprimant les molécules du CMH de classe I. Les cellules infectées chargées de peptides activent les cellules T exprimant les molécules de surface accessoires CD8 et TCR. Les lymphocytes T CD8 + activés produisent de l'IFN- γ et tuent les cellules infectées grâce à leur pouvoir cytotoxique par la libération de perforine et de granzyme et / ou lyse par Fas (JACKSON, 2013).

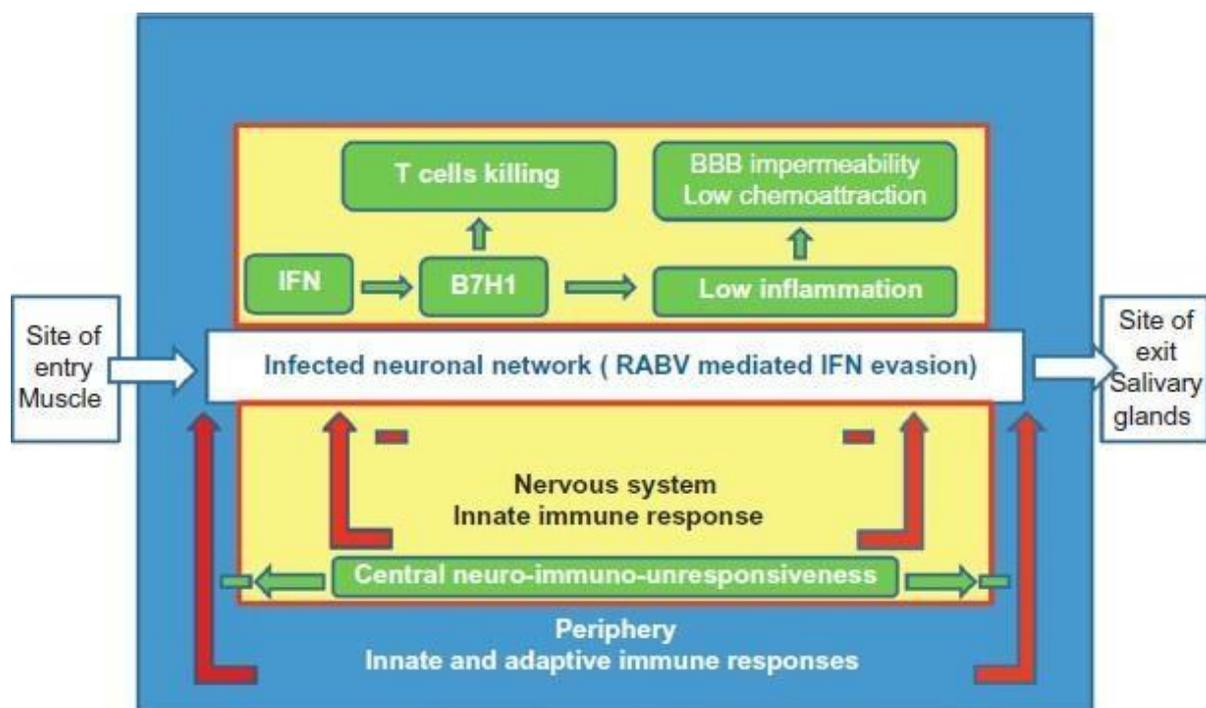


Figure 9 : Les interactions qui se produisent entre le RABV et l'immunité de l'hôte (JACKSON, 2013).

5.4 Immunité adaptative au niveau du système nerveux

La réponse immunitaire adaptative est indépendante de la pathogénicité de la souche virale mais elle arrive bien après que le virus est rentré dans le système nerveux (ce qui explique malgré cela la mort de la personne infectée) (JACKSON, 2013).

La plupart des infections nerveuses sont contrôlées par l'infiltration des lymphocytes T. L'efficacité de cette dernière lors d'infection rabique dépend de la souche. L'infection par une souche pathogène (CVS) (challenge viral standard) provoque une apoptose des cellules T infiltrant le système nerveux. Cette constatation n'était pas observée lors d'infection par une souche abortive (PV) où les cellules apoptotiques étaient les neurocytes (JACKSON, 2013).

L'entrée des cellules T au cerveau après leur activation se fait grâce aux molécules de surface indépendamment de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique qui ne régule pas l'entrée des cellules. Cette infiltration est limitée lors d'inoculation par le CVS, par contre elle est continue lors d'inoculation par la souche abortive. Concernant les lymphocytes B, Les anticorps neutralisants ont été décrits comme un facteur critique pour la protection contre le RABV. La clairance du virus par l'infiltration a été décrite lors de rage abortive. En contrepartie lors d'encéphalite aigue rabique les lymphocytes B dans le cerveau ne sont pas détectés. Suggérant que l'entrée restreint ou la destruction spécifique de lymphocytes B pourrait également contribuer à la virulence du RABV (JACKSON, 2013).

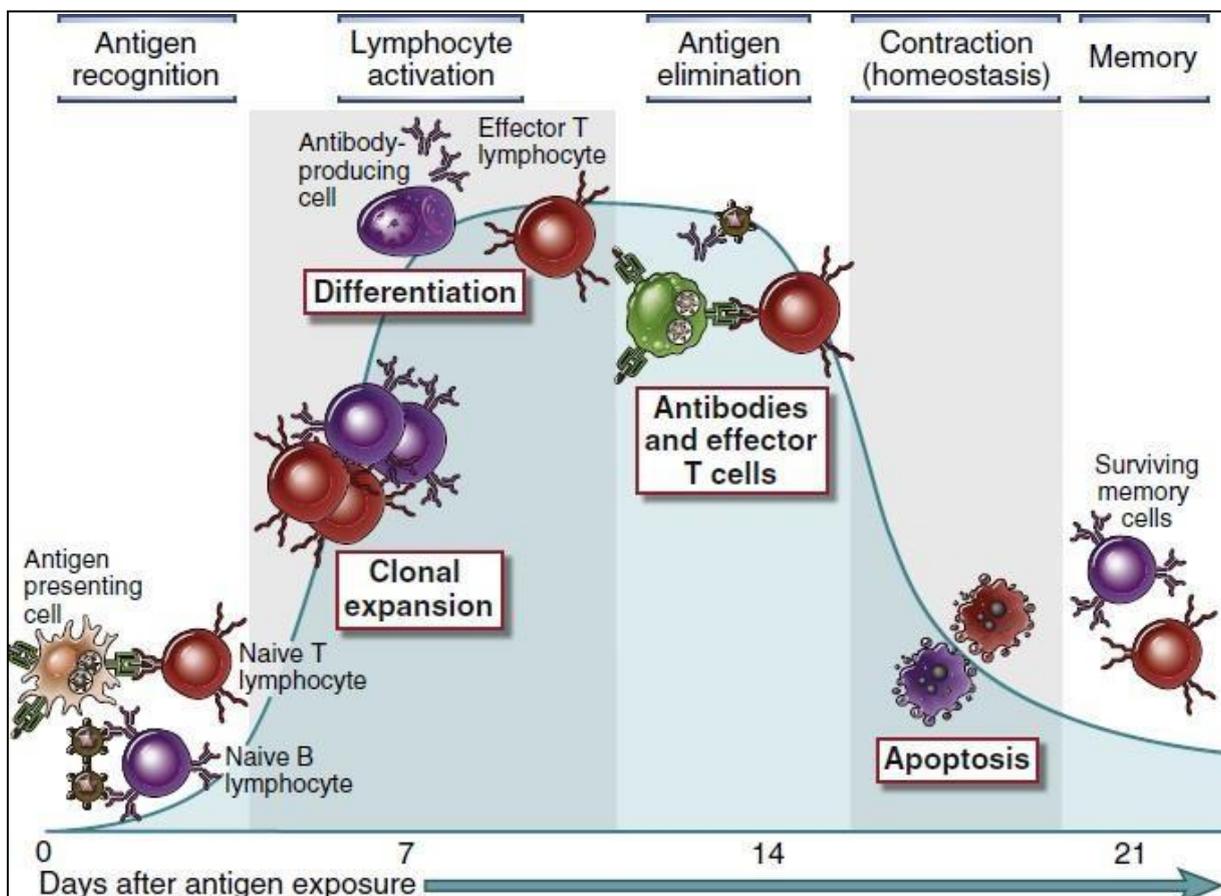


Figure 10 : Phase de la réponse immunitaire adaptative (ABBAS, L, et PILLA, 2016).

6 Symptômes

La durée d'incubation de la rage est habituellement de 10 jours à 6 mois chez les chiens et chats, la plupart c'est entre 2 semaines à 3 mois. Expérimentalement la moyenne qui a été rapporté est de 15 jours chez les bovins, 10 jours chez les ovins et 12 jours chez les équidés. (HUDSON et *al.* 1996a, b ; RADOSTITS et *al.* 2007). Mais peut s'étendre de moins d'une semaine à 1 an, en fonction de facteurs tels que le site de pénétration du virus, la charge virale, l'immunité de l'hôte et la sévérité de la morsure. La période d'incubation est raccourcie dans le cas où le site est proche de la tête et très innervé, par rapport à celle où le site d'inoculation est situé aux extrémités. De façon similaire, des morsures profondes et multiples avec une concentration virale élevée vont provoquer une installation rapide et sévère de la maladie (GARG, 2014).

Les symptômes diffèrent selon les espèces, ce qui conditionne la forme de la maladie exprimée. En outre, certains signes peuvent être si subtils qu'ils passent souvent inaperçus. Généralement, c'est une encéphalite aiguë dont le résultat est toujours fatal. L'un des premiers signes initiaux chez un animal, c'est le changement de comportement. D'autres symptômes peuvent comporter de la fièvre accompagnée de douleurs ou de fourmillements, démangeaisons ou sensations de brûlure inexplicables à l'endroit de la blessure. La propagation du virus dans le système nerveux central entraîne une inflammation progressive et mortelle de l'encéphale et de la moelle épinière (RABIES, s. d.).

La gravité et le site des lésions décident en grande partie du tableau clinique de la maladie. En fonction de ceux-ci, la maladie peut présenter des signes d'irritation (forme furieuse) ou paralytique (forme muette ou paralytique). Beaucoup de cas se situent quelque part entre ces deux formes cliniques (GARG, 2014).

Les virus issus des chauves-souris causent presque toujours une forme paralytique. Le virus dit « fixe » qui a été modifié après plusieurs passages intracérébraux cause une paralysie ascendante à l'opposé de la souche « sauvage ». Il y a aussi une différence géographique dans la proportion d'animaux atteints de la forme furieuse ou paralytique. En Amérique, la plupart des cas sont paralytiques. En Afrique et en Inde, la plupart des cas d'animaux de ferme présentent la forme furieuse (GARG, 2014).



Figure 11 : un chien enragé avec de la salive dégoulinant de la bouche. (HUMANLIFE, 2019)

6.1 Rage furieuse

Chez les animaux les premiers symptômes de la rage furieuse sont :

- L'agitation
- Très grande excitation (où l'animal a tendance à mordre par excitation).
- Ou autres changements de comportement anormaux pour l'animal.

Si l'animal est de nature agitée, il pourra être très tranquille et même chercher à se cacher. À noter que les animaux sauvages deviennent souvent anormalement sociables et n'auront plus peur des humains. Les animaux nocturnes peuvent aussi devenir diurnes lorsqu'ils sont infectés.

Par la suite, il y aura début progressif de la paralysie du larynx et une augmentation de la salivation. Le larynx étant paralysé, il est difficile pour l'animal d'avalier sa salive ce qui donne le symptôme classique de la rage où l'animal salive abondamment. Lorsque ces symptômes arrivent, l'animal meurt d'asphyxie, habituellement dans les 7 jours suivants, due à la paralysie du larynx-pharynx et autres muscles servant à la respiration (RAGE ANIMALE : SURVEILLANCE ET CONTROLE, s. d.)

6.2 Rage paralytique (ou muette)

Cette forme est caractérisée par une période d'excitation beaucoup moins prononcée que la forme furieuse. Il y aura quand même changement de comportement chez les animaux sauvages comme l'inhibition de la peur de l'homme. Il y a aussi la paralysie graduelle du

système respiratoire qui s'installe et mort par asphyxie chez cette forme aussi (RAGE ANIMALE : SURVEILLANCE ET CONTROLE, s. d.).

Chez l'humain, les symptômes commencent par de la fièvre, des maux de tête. Par la suite, il y a aussi une phase d'excitation suivie d'anxiété de confusion de sensibilité à la lumière, d'une peur de l'eau, puis d'hallucination. La paralysie du système respiratoire s'enchaîne et une mort par asphyxie s'en suit (RAGE ANIMALE : SURVEILLANCE ET CONTROLE, s. d.)

7 Diagnostic de la rage

L'établissement d'un diagnostic clinique de la rage est délicat et d'une fiabilité limitée. En effet, les signes cliniques de la maladie, bien que dominés par des symptômes nerveux, restent pléomorphes et non spécifiques chez l'animal et l'homme. Seule l'hydrophobie ou l'aérophobie peut être considérée comme pathognomonique de la rage humaine, mais elle n'est pas toujours retrouvée (GARG, 2014).

Ainsi, la confirmation du statut enragé d'un animal ou d'un individu repose uniquement sur la réalisation du diagnostic biologique. En prenant en considération la nature de la maladie, c'est primordial que la nature des tests doit être correctement standardisée, rapide, le plus fiable possible en termes de sensibilité et de spécificité. Cela guide aussi à la nécessité d'institué des mesures de contrôle épizootique dans la zone. Des résultats rapides peuvent épargner le patient des traumatismes physiques et psychologiques inutiles ainsi que des charges financières, si l'animal ou l'être humain n'est pas enragé (GARG, 2014).

7.1 Diagnostic chez les animaux

Chez les animaux la rage est diagnostiquée à l'aide du test d'immunofluorescence directe. Le but est de trouver les antigènes dans le tissu cérébral. L'animal doit être euthanasié pour le test. La collection de l'échantillon issu du cerveau de l'animal suspecté et son expédition vers un laboratoire de diagnostic prend du temps bien que la conduite du test nécessite environ 2 h seulement (GARG, 2014).

7.2 Diagnostic chez l'être humain

Durant l'infection, le virus rabique est dissimulé à la surveillance immunitaire par sa localisation intra neuronale. Les anticorps dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien sont pratiquement pas détectables voir rarement détecté avant la déclaration de la maladie ou

pendant sa progression. Par conséquent aucun test est fiable pour diagnostiquer l'infection rabique chez l'homme avant l'installation des signes cliniques (GARG, 2014).

Le diagnostic intra vitam (ante mortem) de la rage une fois les manifestations cliniques déclarées, nécessite plusieurs tests, aucun test seul n'est suffisant. Les tests sont réalisés sur des échantillons de salive, de sérum, de liquide céphalo-rachidien et des biopsies cutanées des follicules pileux au niveau de la nuque. La salive sert à l'isolation du virus ou à la transcription inversée suivie d'une réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR). Le sérum et le liquide spinal servent à détecter les anticorps. Les échantillons de biopsie cutanée sont examinés pour révéler les antigènes rabiques dans les nerfs cutanés à la base des follicules pileux. En post-mortem, la technique diagnostic standard consiste à détecter l'antigène du virus de la rage dans le tissu cérébral par le test d'immunofluorescence directe. Plusieurs nouvelles techniques et protocoles ont été proposés pour le diagnostic de la rage ; Cependant, le nombre signalé de cas de rage humaine confirmés en laboratoire restent limités, en particulier en Asie et en l'Afrique, ce qui entraîne des sous-estimations du réel impact de la maladie (GARG, 2014).

L'identification de la rage ou de l'un de ses constituants fournissent un diagnostic de certitude. Le test le plus utilisé pour le diagnostic de rage est le test d'immunofluorescence directe, qui est recommandé par l'OMS et l'OIE, sensible, spécifique, et pas chère. Dans le cas où le résultat par l'immunofluorescence directe est peu concluant ou dans tous les cas d'exposition humaine, d'autre test comme la culture cellulaire ou l'inoculation à des souris sur le même échantillon peuvent être envisagée. Refaire l'immunofluorescence directe sur d'autres échantillons peut aussi être recommandé. Ceci est particulièrement important lorsque l'autolyse de l'échantillon est confirmée ou suspectée (GARG, 2014)

7.3 Diagnostic de laboratoire

En résumé, le diagnostic de laboratoire de la rage animale et humaine peut être fait par 4 méthodes : histopathologie, culture du virus, sérologie et détection de l'antigène du virus. Bien que chacune des 3 premières méthodes présente des avantages distincts, aucune n'offre un diagnostic définitif rapide (VIRAL ZOONOSES SLIDE SET, s. d.).

Histopathologie : les corps de Negri sont pathognomoniques de la rage. Cependant, ils ne sont présents que dans 71% des cas (VIRAL ZOONOSES SLIDE SET, s. d.).

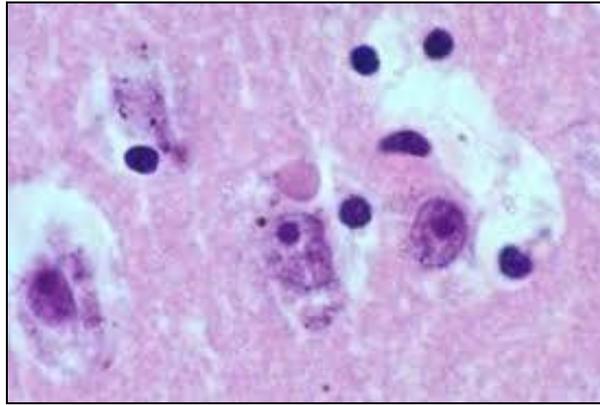


Figure 12 : Corps de Negri ; inclusions cytoplasmiques dans cellules de cerveau de chien, signe de l'infection (RABIES DIAGNOSIS, s.d.).

- Culture de virus : le moyen de diagnostic le plus définitif est la culture de virus à partir de tissus infectés. La méthode la plus couramment utilisée pour l'isolement du virus consiste à inoculer la salive, les tissus des glandes salivaires et les tissus cérébraux par voie intracérébrale à des souris. Les souris devraient développer une paralysie et la mort dans les 28 jours. À la mort, les cerveaux sont examinés pour la présence du virus par immunofluorescence (VIRAL ZOOSES SLIDE SET, s. d.).
- Sérologie : les anticorps circulants apparaissent lentement au cours de l'infection, mais ils sont généralement présents au moment de l'apparition des symptômes cliniques. Les tests sérologiques les plus couramment utilisés étaient le test de neutralisation de l'infection de souris ou le test d'inhibition rapide de la focalisation fluorescente RFFIT. La sérologie représente la méthode la plus utile pour le diagnostic de la rage (VIRAL ZOOSES SLIDE SET, s. d.).
- Détection rapide des antigènes viraux : ces dernières années, la détection d'antigènes viraux par immunofluorescence était devenue largement utilisée. Le tissu potentiellement infecté est incubé avec un anticorps marqué à la fluorescéine. Les cellules sont examinées par microscopie fluorescente pour la présence d'inclusions intracytoplasmiques fluorescentes. Les échantillons habituellement utilisés sont des empreintes cornéennes (obtenues en abrasant doucement la cornée avec une lame microscopique) ou une biopsie cutanée du cou (les cellules examinées sont les nerfs sensoriels) (VIRAL ZOOSES SLIDE SET, s. d.).

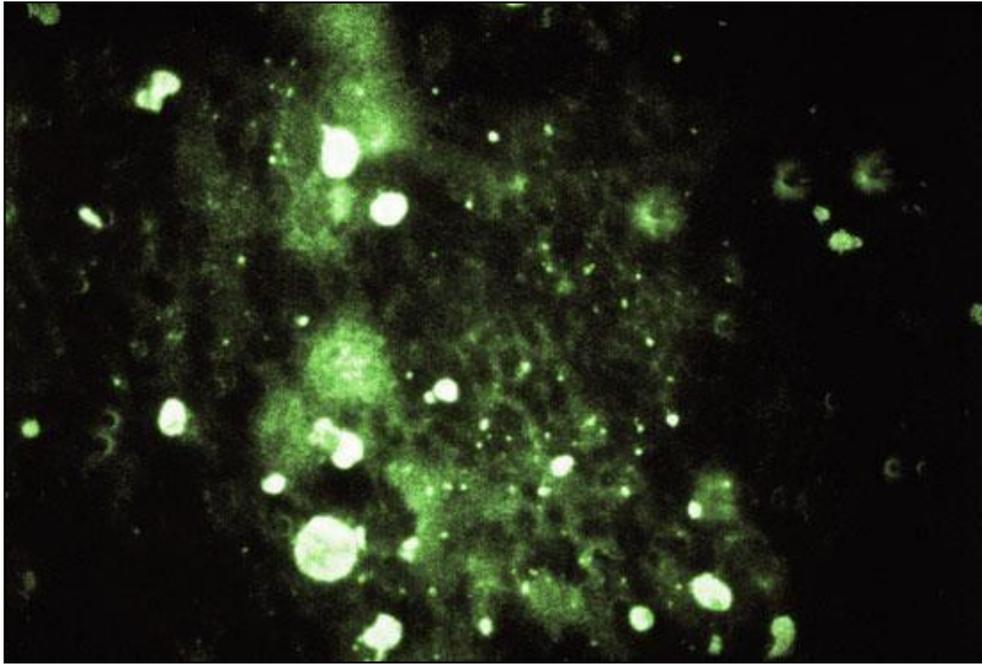


Figure 13 : Micrographie révélant un résultat positif du a la présence d'antigène antirabique avec la technique d'immunofluorescence directe (GARG,2014).

8 Traitement et prévention

Il n'existe aucun traitement contre la rage. Dès qu'un humain ou un animal développent des symptômes, il est condamné à une mort certaine. Cependant, il est possible de recevoir un vaccin après une morsure avant que les symptômes apparaissent qui empêche le développement des symptômes et ainsi sauve la vie de l'animal ou de la personne. Ce vaccin post-exposition doit cependant être administré rapidement après la morsure (RAGE ANIMALE : SURVEILLANCE ET CONTROLE, s. d.)

8.1 Vaccination préventive

- a) concerne les catégories socioprofessionnelles exposées à des risques permanents de contamination (vétérinaires etc.) (TPE LA RAGE, s. d.).

Le protocole est simple : 3 injections administrées à j0, j7, j28 et le rappel est effectué un an après (MON CARNET DE VACCINATION ELECTRONIQUE, POUR ETRE MIEUX VACCINE, SANS DEFAUT NI EXCES, s. d.)

8.2 Prophylaxie post-exposition

Se compose des étapes suivantes :

- Toutes les morsures, égratignures et sites d'exposition au virus rabique doivent être soignés dès que possible après l'exposition ; lavage en profondeur et rinçage de la plaie pendant environ 15 minutes, avec du savon ou un détergent, de grandes quantités d'eau sont nécessaires. Lorsqu'elle est disponible, une préparation topique contenant de l'iode ou un virucide similaire doit être appliqué sur la plaie.
- Une série d'injections de vaccin contre la rage doit être administrée rapidement après une exposition.
- Le sérum antirabique doit être administré pour les expositions sévères de catégorie III. Les plaies nécessitant une suture doivent être suturées sans serrer et seulement après infiltration sérum dans la plaie.

Les catégories d'exposition à la rage selon l'OMS sont (RABIES VACCINES AND IMMUNOGLOBULINS : WHO POSITION APRIL 2018) :

- Catégorie I : toucher ou nourrir les animaux, l'animal lèche la peau intacte (pas d'exposition).
- Catégorie II : ronger une peau non couverte, égratignures ou écorchures mineures sans saignement (exposition).
- Catégorie III : Morsures ou égratignures transdermiques simples ou multiples, contamination de la peau lésé ou muqueuse par la salive provenant de léchage d'animaux, expositions par contact direct avec des chauves-souris (exposition sévère).

Tableau 1 : la prophylaxie post exposition recommandée selon la catégorie d'exposition (RABIES VACCINES AND IMMUNOGLOBULINS : WHO POSITION APRIL, 2018) :

Expositions Individus	Exposition de catégorie I	Exposition de catégorie II	Exposition de catégorie III
individus de tout âge immunologiquement naïfs	Laver la peau exposée. Pas de prophylaxie obligatoire.	Lavage des plaies et vaccination immédiate. Le sérum antirabique n'est pas indiqué.	Lavage des plaies et vaccination immédiate. L'administration sérum antirabique est indiquée.
individus de tout âge précédemment immunisé	Laver la peau exposée surfaces. Pas de prophylaxie obligatoire.	Lavage des plaies et vaccination immédiate. Le sérum antirabique n'est pas indiqué.	Lavage des plaies et Vaccination immédiate. Le sérum antirabique n'est pas indiqué.

Vaccins antirabiques

1. Réponse vaccinale

La vaccination consiste à introduire chez un individu une préparation antigénique (La glycoprotéine G concernant la rage) issue du virus rabique, de manière à créer une réponse immunitaire capable de le protéger contre la survenue de la rage. Le vaccin répond à un cahier de charge précis : la sûreté du produit (il n'induit en aucun cas la maladie), Induit une protection durable et surtout pratique (faible coût, stable, administration aisée) (VACCINS : LES POINTS ESSENTIELS. s. d. 2020)

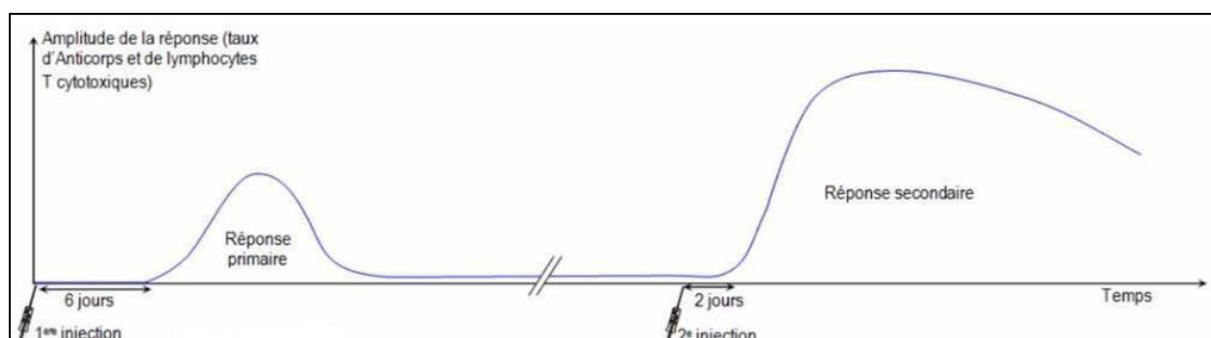


Figure 14 : Une représentation schématisée du taux d'anticorps lors de la première injection et à la deuxième injection (VACCINS : LES POINTS ESSENTIELS. s. d. 2020)

Tout protocole vaccinal comprend une primovaccination :

La première injection à J1 donne une réponse primaire d'anticorps caractérisé par une apparition lente, à une réponse réduite et à une sécrétion d'IgM supérieure à celle des IgG (qui sont les plus intéressants lors d'infection).

Les deux injections à j7 et j28, vont provoquer une réponse secondaire qui sera plus rapide distingué de la première par une production d'anticorps plus important avec prédominance des IgG.

2. Types de vaccin antirabique

Plusieurs types de vaccins antirabiques sont disponibles. Basé sur le substrat pour la production de vaccins, ils peuvent être largement classés comme première génération et deuxième génération. Ces générations de vaccins sont en outre classées comme vaccins atténuées (à base de virus vivant, répliatif) et inactivés (à base de virus inactivé, non répliatif) (MESLIN et al, 1996). Avec l'aide de nouvelles technologies, des vaccins

recombinants ou à sous-unités sont en cours de développement. Ceux-ci sont appelés vaccins de troisième génération (NANDI & KUMAR, 2010).

2.1 Vaccins antirabiques de première génération

La première génération de vaccins antirabiques a été produite à partir de substrats d'animaux tels que le tissu cérébral et les œufs embryonnés. L'utilisation de tissus nerveux d'animaux adultes pour la production du vaccin était basée sur des techniques développées par Louis Pasteur. Tissus nerveux de moutons, chèvres, rats, lapins et souris ont tous été utilisés pour la production de vaccins, embryons de canard et de poulet (UMENO, 1921). Vivant et inactivés les vaccins de première génération ont été largement utilisés chez les animaux également (PEREZ et PAOLAZZI, 1997).

L'encéphalomyélite et la polynévrite étaient les complications les plus courantes après l'administration de vaccins de tissus cérébraux d'animaux adultes chez l'homme (MESLIN et *al*, 1996). Des signes similaires ont également été observés chez les moutons, les chiens, les primates et les animaux de laboratoire (JERVIS, 1954 ; OMS, 2013).

Des études ont démontré que les complications étaient dues à réactions allergiques à la protéine basique de la myéline (EYLAR et *al*, 1969). Pour surmonter les effets secondaires neurologiques et autres liés au tissu cérébral des animaux adultes des vaccins, des tissus cérébraux de nouveau-nés allaités ont été utilisés, car ils étaient considérés comme exempts de myéline. La production de vaccins à partir d'embryons d'oiseaux a été préconisée comme alternative pour réduire les complications neurologiques (PECK et *al*, 1955), mais ces vaccins ont présenté des complications neurologiques, bien qu'à un degré moindre que les vaccins à tissu nerveux. (TREJOS et *al*, 1974).

Les vaccins antirabiques préparés à partir de tissus nerveux ou d'œufs embryonnés, inévitablement contenaient de grandes quantités de protéines tissulaires. Ces protéines ont provoqué des réactions allergiques et ont inhibé de manière compétitive l'expression des anticorps de l'hôte contre les protéines virales ainsi la diminution de la puissance vaccinale (FENJE, 1960).

2.2 Vaccins antirabiques de deuxième génération

En 1958, Kissling a propagé avec succès le virus de la rage dans les cellules rénales de hamster (KISSLING, 1958). Par la suite, le virus de la rage s'est également propagé dans les

cellules rénales porcines et canines (ABELSETH, 1964). Cela a conduit au développement de vaccins dérivés de cultures cellulaires de seconde génération (FENJE, 1960). Des vaccins atténués et inactivés peuvent être produits en utilisant une culture cellulaire (ABELSETH, 1964).

Les lignées de cellules de rein de bébé hamster (BHK-21) ou d'embryon de poulet sont utilisées pour la production de vaccins antirabiques à usage vétérinaire (KALLEL et al, 2002). Les cultures de cellule BHK-21 ont l'avantage d'une réplication rapide du virus qui produit de grands volumes de virus et permettent la production à grande échelle de vaccins (SUREAU, 1987 ; PEREZ& PAOLAZZI, 1997).

L'un des principaux problèmes liés à la production de vaccins à partir de cultures cellulaires était l'exigence d'ajout de sérums d'animaux pour augmenter la prolifération cellulaire. Ce fut un inconvénient important, car le sérum animal de haute qualité est coûteux et donc considérablement augmenté le coût de la production de vaccins de culture cellulaire par rapport aux vaccins dérivés de tissus. D'autres problèmes liés à la production de vaccins par culture cellulaire comprennent une variation importante entre les lots de cultures et le risque de contamination par des micro-organismes tels que les bactéries, les champignons et les virus (PAY et al, 1985).

2.2.1 Vaccins atténués ou vivants

Les vaccins atténués peuvent être produits soit par atténuation en série *in vitro* en utilisant des cultures cellulaires (BHK-21) ou des passages *in vivo* chez la souris (MESLIN et al, 1996). La suspension virale récoltée est ensuite diluée pour produire une dose suffisante pour immuniser les espèces cibles.

Les vaccins atténués sont plus simples et moins chers à produire car les exigences pour les cultures virales et les cellules sont beaucoup plus basses. De plus, comme le virus est vivant, il peut infecter et se répliquer dans cellules hôtes induisant une meilleure réponse immunitaire (en termes de titre et de durée de protection). La vaccination est simple car les vaccins peuvent être administrés par voie orale, intranasale ou par voie intraoculaire et intramusculaire. C'est particulièrement utile pour la lutte contre la rage chez les animaux sauvages où l'administration orale via des appâts est la méthode la plus pratique (BROCHIER et al, 1991).

Le principal problème avec le vaccin atténué est le risque de pathogénicité résiduelle. Il y a des cas de rage induite par le vaccin ont été signalés chez des carnivores et des bovins sauvages. La pathogénicité résiduelle pose également un risque potentiel pour les gestionnaires et la contamination de l'environnement si le virus revient à son type sauvage pathogène. En outre, les vaccins atténués étaient sensibles à de légères variations de température de la chaîne froide et ont entraîné une perte d'immunogénicité (RODRIGUES, S. et *al*, 2000).

2.2.2 Vaccins inactivés

Actuellement, ce sont les vaccins les plus utilisés pour la prévention de la rage. Le virus entier est inactivé par la chaleur ou des agents chimiques. La bêta-propiolactone, l'éthylène-imine et le thimérosal sont des agents couramment utilisés pour l'inactivation du virus (MINKE et *al*, 2004). Ils inactivent le virus sans affecter son antigénicité.

Après inactivation, le virus est concentré par ultrafiltration, et des adjuvants tels que l'hydroxyde d'aluminium et le phosphate d'aluminium sont ajoutés pour améliorer la réponse immunitaire. Le vaccin peut être conservé sous forme lyophilisé ou dans une suspension liquide (MESLIN et *al*, 1996). Les souches de virus utilisées pour la production de vaccins inactivés comprenaient le virus d'épreuve standard 11 (CVS), Pittman-Moore, Nishigahara et le virus Pasteur. La plupart des vaccins inactivés actuellement utilisés sont produits en utilisant culture cellulaire telle que les lignées cellulaires BHK-21 (OMS, 2013).

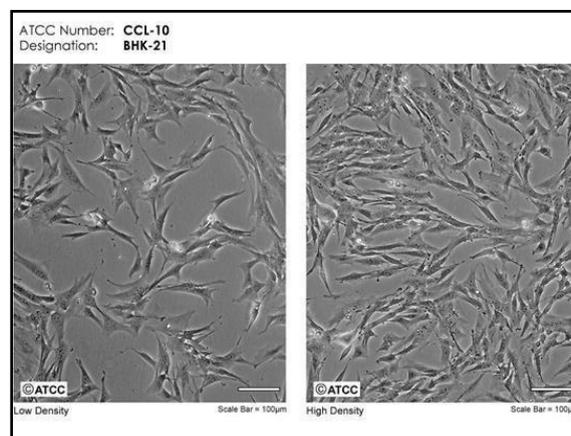


Figure 15: Photo de la lignée cellulaire BHK-21 (ATCC: THE GLOBAL BIORESOURCE CENTER s. d.).

Les vaccins inactivés sont plus stables et plus sûrs à utiliser que les vaccins vivants (MESLIN *et al*, 1996), s'il était bien préparé, il ne devrait pas y avoir de risque de retour à sa forme pathogène. Après l'achèvement des protocoles de vaccination, les vaccins inactivés peuvent produire une immunité à long terme. Des essais chez l'homme ont montré une protection qui dure aussi longtemps que 14 ans. En outre, des expériences chez les chiens ont démontré une immunité protectrice même à de faibles titres d'anticorps détectables (MESLIN *et al*, 1996). Un autre avantage est que les vaccins inactivés peuvent être utilisés en combinaison avec d'autres vaccins. Des essais réussis ont été menés à l'aide d'un vaccin combiné contenant la rage et la fièvre aphteuse chez les veaux (PALANISAMY *et al*, 1992).

Cependant, les vaccins inactivés ne sont pas aussi immunogènes que les vaccins vivants. En particulier, la réponse immunitaire est plus lente et de grandes quantités d'antigène, d'adjuvants puissants et des doses de rappel sont nécessaires pour induire une immunité adéquate. Comme les cellules hôtes ne sont pas infectées par les vaccins inactivés, ils induisent une réaction immunitaire plus faible à médiation cellulaire que celle induite par les vaccins vivants (MINKE *et al*, 2004). Bien que des adjuvants tels que l'hydroxyde d'aluminium et le phosphate d'aluminium améliorent la réponse immunitaire, ils peuvent provoquer des réactions allergiques au site d'injection ainsi que des sarcomes et troubles auto-immunes (DAY, 2006). Enfin, une inactivation incomplète pourrait être dangereuse pour le personnel et l'environnement (MINKE *et al*, 2004).

Le besoin d'une masse antigénique plus élevée, d'adjuvants puissants et d'un processus efficace d'inactivation signifie que même si le sérum animal n'est pas requis, le coût de production des vaccins inactivés est plus élevé que ceux des vaccins vivants.

2.3 Vaccins antirabiques de troisième génération

Les vaccins antirabiques de troisième génération comprennent l'acide désoxyribonucléique (ADN) et des vaccins recombinants. Ces vaccins ont été développés pour réduire la pathogénicité des vaccins vivants et en même temps d'augmenter leur puissance. À base d'ADN les vaccins sont construits sur un vecteur plasmidique qui exprime la glycoprotéine du virus de la rage. Ces types de vaccins sont faciles à produire et en outre, le plasmide bactérien a un effet adjuvant qui a augmenté l'ampleur et la durée de la réponse immunitaire (WANG *et al*, 1998).

Des vaccins antirabiques recombinants ont été développés en utilisant des virus tels que le poxvirus, les adénovirus et les rhabdovirus comme vecteurs, des phénotypes viraux avirulents ont été obtenus en remplaçant le codon arginine en position 333 dans la séquence du gène de la glycoprotéine avec d'autres acides aminés tels que la glycine, la leucine ou la cystéine (TUFFEREAU et *al.* 1989). Cette séquence génique avirulente a ensuite été insérée dans des virus vecteurs pour produire un vaccin antirabique recombinant (BROCHIER et *al.* 1991). Les vaccins recombinants sont efficaces lorsqu'ils sont administrés par voie orale et sont donc principalement utilisés chez les animaux sauvages. Le vaccin est plus sûr car aucun virus vivant de la rage n'est utilisé dans sa production (OIE, 2013). Cependant, l'efficacité et les effets secondaires du vaccin antirabique recombinant doivent être approfondis. Les vecteurs peuvent provoquer des maladies chez les animaux inoculés et les humains. Des mutations pourraient survenir dans gènes insérés et ainsi restaurer la virulence de la rage (SUGIYAMA & ITO, 2007).

PARTIE EXPERIMENTALE

Objectif de l'étude

Les seuls moyens médicaux de lutte contre la rage sont la prophylaxie pré et post exposition. Sur le marché Algérien, deux types de vaccins sont disponibles : le vaccin importé cellulaire et le vaccin tissulaire fabriqué au niveau de L'IPA (RAGIVAC N.D). D'où l'objectif de cette partie qui représente une étude descriptive du processus de fabrication du vaccin antirabique au sein de l'institut PASTEUR d'ALGER.

Matériels

1. Animaux

- Souriceaux : Des souriceaux de 4 jours de souche NMRI non consanguine sans distinction de sexe. Ces souriceaux proviennent du service d'animaux de laboratoire qui entretiennent l'élevage de cette souche à l'IPA de KOUBA.
- Souris : souche NMRI.

2. Souche virale utilisée

- La souche virale fixe de Louis Pasteur-Saigon.

Cette souche a été obtenue après de nombreux passages du virus de lapin à lapin afin d'obtenir un virus doué d'une virulence stable. Louis Pasteur et Emile Roux ont inoculé la matière virulente (parcelle d'encéphale de chien enragé) à des lapins après avoir essayé sur des chiens. L'expérience reproduite sur des lapins présente moins de risque pour le manipulateur.

Louis Pasteur a obtenu un vaccin en diluant la virulence du virus contenu dans la moelle épinière des lapins. Il a décidé de suspendre la moelle de lapin dans des flacons où elle est exposée à l'air, dans une atmosphère exempte d'humidité ce qui entraîne la diminution de la virulence jusqu'à sa disparition (TROISIEME EPOQUE : 1877 - 1887 2016).

L'entretien de la souche virale en vue de la fabrication du vaccin se fait sur cerveau de lapin.

Une suspension de cerveau de lapin infecté est préparée dans l'eau distillée stérile et conservée par congélation (-20°C) (Master lot).

Elle constitue le lot de semence à partir duquel on prépare la suspension pour l'inoculation aux souriceaux nouveau-nés, à condition qu'elle réponde aux différents critères après réalisation de tests de stérilité et de titrage (Seed lot).

Caractéristiques de la souche fixe (caractère constant et permanent qui sont propres à la

souche) :

- Durée d'incubation
- Manifestation clinique (Symptômes)
- Pouvoir pathogène, en fonction des voies d'inoculation
- Lésion histologique (Corps de Negri)

3. Matériel non biologique

Tampons/ réactifs :

Bêta-propiolactone : inactive la suspension virale du vaccin avant la lyophilisation

Merthiolate : éthyle mercure (thiomersal) conservateur antiseptique et antifongique

Solution d'Enders : tampon stabilisant qui contient du phosphate de sodium monosodique, chlorure de sodium, soude et de l'eau permutée.

Appareillages :

- Agitateurs magnétiques
- Centrifugeuse réfrigérée
- Balance
- Chambre chaude +37°C
- Pompe à vide
- Pompe péristaltique
- Hotte à flux laminaire : PSM II (poste de sécurité microbiologique)
- Vortex
- Congélateur -20°C

Méthodes

La production du vaccin antirabique à usage humain est réalisée par la technique Fuenzalida-Palacios utilisant comme substrat de production des souriceaux à la mamelle car ses animaux sont moins encéphalotogène (LABORATOIRE DES VACCINS ET SERUMS ANTIRABIQVES s. d.).

Les qualités primordiales de ce vaccin comme tout vaccin antiviral sont : l'innocuité, l'activité, la stabilité et facilité de production.

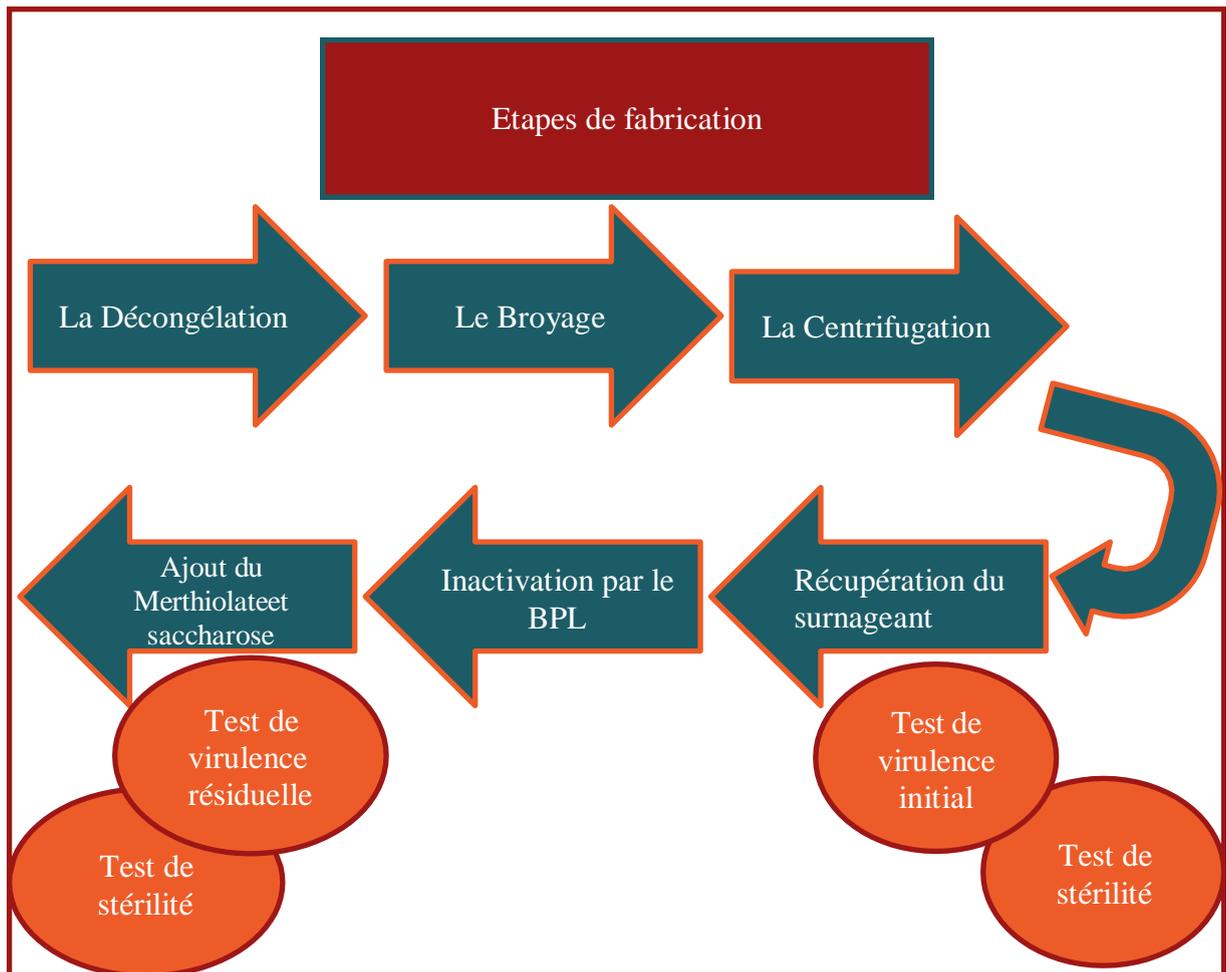


Figure 16 : diagramme récapitulatif des étapes de fabrication et des points de contrôles.
Diagramme personnel

1. Préparation de la matière cérébrale

1.1 Inoculation :

L'inoculum est préparé à partir du lot de semence, la suspension obtenue doit contenir environs 100 DL50. L'injection de 0.01ml de l'inoculum se fait par voie intracérébrale à des souriceaux nouveau-nés âgés de moins de 4 jours.



Figure 17: souriceaux nouveaux nés de moins de 4 jours prêts à être inoculé séparés des souris adultes. Photo personnelle

1.2 Récolte :

Quatre jours après l'inoculation, tous les souriceaux vont présenter des paralysies et sont donc euthanasiés. Ils sont maintenus sur un support en bois au moyen d'un lien en caoutchouc en prenant soin de bien présenter la boîte crânienne de façon à être la plus externe possible. La peau de la tête et du cou de chaque animal est désinfectée avec de la teinture d'iode.

Dans une enceinte fermée équipé d'une hotte à flux laminaire, on aspire les cerveaux à l'aide d'une pompe-à-vide reliée à un flacon contenant une solution d'antibiotiques (kanamycine, pénicilline).

Le trocart qui est reliée au flacon est planté dans la cavité crânienne (région frontale) ce qui permet l'aspiration de la matière cérébrale. Durant ce prélèvement le flacon est plongé dans de la glace pilée, de manière que les cerveaux ainsi récoltés sont mis sous une agitation à froid (+4°C) durant 2 à 3 heures pour homogénéiser et introduire la kanamycine. Puis ils sont conservés à -70°C jusqu'à utilisation.



Figure 18: souriceaux euthanasiés par l'éther. Photo personnelle

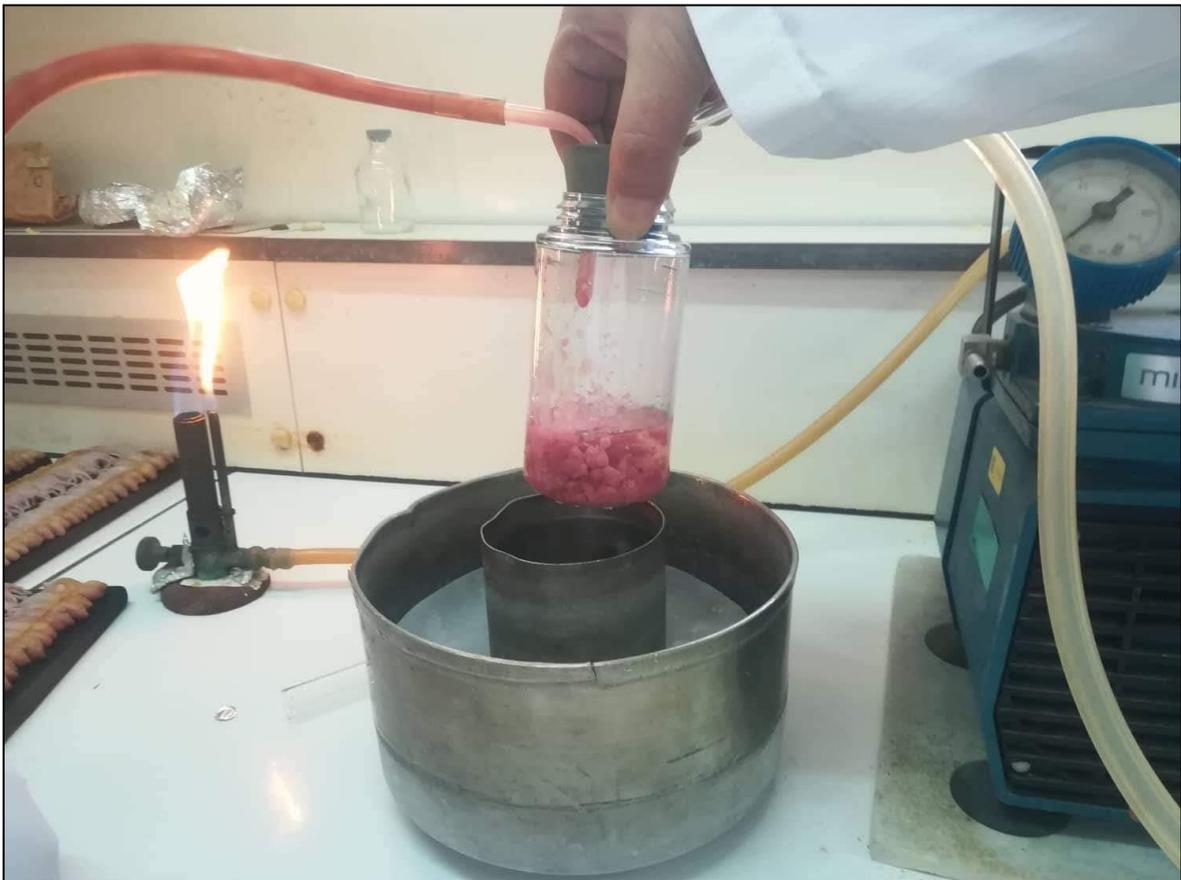


Figure 19: matière cérébrale virulente récoltés. Photo personnelle

2. Préparation du vaccin

Cette préparation se fait dans un local muni d'une hotte à flux laminaire.

Mode opératoire :

Une quantité appropriée de matière cérébrale est décongelée sous l'eau du robinet et le mélange est soumis à un broyage pendant 15 minutes.

La suspension tissulaire est centrifugée pendant 1h à 3000tours/min, le surnageant recueilli est clarifié, additionné dans une jarre a un litre et demi de solution d'Enders.

Le jarre est relié à une pompe péristaltique par une tubulure qui permet de transférer le mélange à un Bulk contenant 9 litres de solution d'Enders.

Laisser en agitation pendant un certain temps. Puis deux prélèvements seront réalisés (2 fois 10 ml du mélange) : l'un servira à titrer la virulence initiale du virus et l'autre à vérifier la stérilité du mélange.

Ensuite le virus est inactivé à la b -Propriolactone durant au moins 4 heures à température ambiante.

Une fois les 4 heures écoulées, le merthiolate (50ml) est additionnée (1g pour 15 litres de suspension vaccinale).

Prélever encore une 2 fois 10ml du mélange pour vérifier l'inactivation du virus (test d'activité résiduelle) et la stérilité.

Afin de contrôler la qualité de la production du vaccin, un ensemble de tests in-vivo (les tests de virulence initiale, d'activité résiduelle, d'activité NIH) et in-vitro (test de stérilité) sont réalisés sur des échantillons tout au long du processus et en particulier en amont et en aval de l'étape d'inactivation virale.

La solution de vaccin en bulk est répartie dans des flacons uni dose à raison de 0,77 ml/flacon, avant lyophilisation du produit. Un autre contrôle de qualité (stérilité, activité et toxicité) est réalisé sur le produit conditionné, après reconstitution du vaccin.

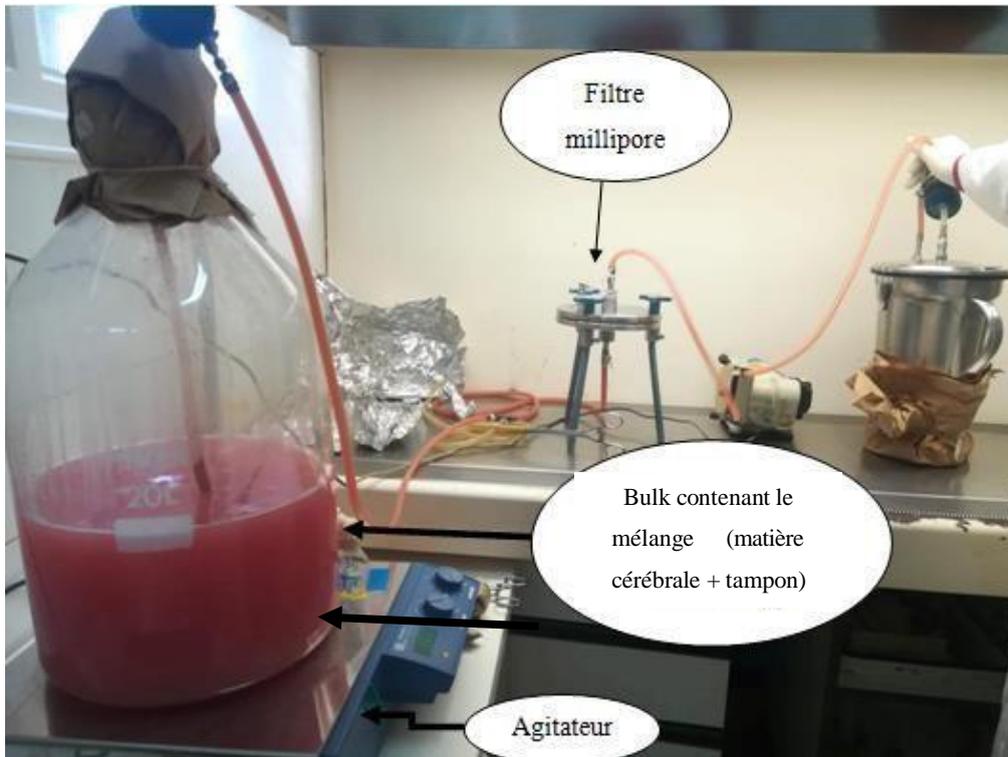


Figure 22: inactivation de la matière cérébrale. Photo personnelle

3. Test de contrôle

- Test de virulence initiale :

L'objectif de ce test est de connaître le titre de la suspension en particules virale avant l'inactivation.

Le titrage d'une suspension virale (surnageant) consiste à évaluer le nombre de particules infectieuses par unité de volume en calculant la dose létale capable de tuer 50% des souris inoculées par voie intracérébrale (DL50)

- Test d'activité résiduelle :

L'objectif de ce test est de vérifier l'absence de virus viable dans le vaccin inactivé.

Cette épreuve est réalisée sur un échantillon de la suspension virale inactivée et prélevé avant l'addition d'autres substances, qui sera inoculé à des souris par voie intracérébrale.

Toutes les souris d'épreuve seront gardées en observation au moins 16 jours ; pendant cette période aucun animal ne devra présenter des symptômes de rage ou d'une autre atteinte du système nerveux centrale.

4. Test de stérilité

L'objectif de ce test est de vérifier l'absence de germes dans les suspensions. Il doit être effectué sur la suspension virale avant et après son inactivation.

Les milieux de cultures suivants sont appropriés pour l'épreuve de stérilité :

Le milieu liquide au thioglycolate est essentiellement destiné à la culture des bactéries anaérobies, mais il permet aussi la culture des bactéries aérobies. Le milieu aux peptones de caséine et de soja (bouillon trypticase soja) est surtout destiné à la culture des bactéries aérobies, mais il permet aussi la culture des champignons.

Cette épreuve doit s'effectuer dans des conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter toute contamination accidentelle durant l'essai ce qui donnerait des lectures faussement positives.

En utilisant au minimum 10ml de vaccin, on ensemence 2 tubes de milieu aux peptones de caséine et de soja, et deux tubes de milieu au thioglycolate. Une partie des milieux destinés à la détection des bactéries est incubé à 37°C et une partie destinée à la détection des champignons à température ambiante pendant au moins sept jours. Des milieux témoins non inoculés seront incubés à chacune des températures d'incubation.

Les milieux sont examinés à l'œil nu pour détecter une croissance de microorganismes pendant et à la fin de la période d'incubation.

Si aucune croissance de microorganisme n'est observée, la préparation examinée est considérée comme stérile, dans le cas contraire la multiplication de microorganismes dans la suspension se traduit par une turbidité du bouillon. Celle-ci est rejetée, c'est à dire ne passe pas le test de stérilité.

5. Test d'activité (NIH)

Le principe du test NIH consiste à immuniser des souris avec des concentrations variables de vaccin, puis à les soumettre à une épreuve virulente.

Les dilutions utilisées sont : 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125 (10 souris pour chaque dilution, un total de 50 souris)

Le protocole de vaccination des souris ; j1 et j7, épreuve par le virus rabique challenge le j14.

Pendant 16 jours nous rapportons le nombre de souris vivante, morte et paralysée.

Le but de ce test est de calculer la DE50 et la valeur antigénique du vaccin testé et de la comparée au vaccin de référence (qui doit subir la même épreuve) avec une valeur antigénique connue.

Deux facteurs doivent être pris en compte :

La DL50 du vaccin utilisé sur les souris doit être entre 5 et 50 DL50, sinon soit il va être très létal ou pas du tout virulent.

La valeur antigénique du vaccin test ne doit pas être inférieure à 0.3 sinon ce dernier est rejeté.

Calcul de la valeur antigénique :

Exemple du lot S299 :

$$\text{Log}_{10}(\text{de la dilution correspondante}) \text{ létal à } 5\% = k + x$$

x : logarithme de l'inverse de la plus faible dilution.

k: titre constant dépend du nombre de souris vivante et du nombre de souris utilisé selon les tableaux en annexe.

$$\text{Log}_{10}(\text{de la dilution correspondante}) \text{ létal à } 5\% = 0.7 + 0.98$$

$$10^{-1.68} (\text{DE50 absolue}) - \text{DE50 du vaccin de référence } (10^{-2.31}) = 1.68 - 2.32 = A(-0.63)$$

$$\text{Anti log de } A = B / \text{anti log } -0.63 (10^{-0.63}) = 0.23$$

$$B * \text{ la Va du vaccin de référence } (1.86) = \text{ Va du vaccin à expertiser } = 0.23 * 1.86 = 0.43$$

Résultats

Nous avons suivi le déroulement de la fabrication du vaccin jusqu'à l'obtention des résultats des tests de 17 échantillons de différents lots.

1. Résultat du test d'innocuité

Nous avons apporté les résultats des différents tests effectués sur le vaccin lors de la production de deux lots à expertisés. Par ordre de prélèvement, nous exposerons les résultats des tests de virulence initiale, d'activité résiduelle et du test NIH qui est très important lors du contrôle du vaccin.

2. Résultat du test de virulence initiale

Après récupération de la matière cérébrale, l'un des tests primordiaux à pratiquer avant l'inactivation du virus, c'est le test de virulence initiale. L'inoculation par quatre dilutions graduelles de matière virulente, de trois groupes composés de dix souris chacun nous a donné les résultats représentés dans le tableau 2. Il est important de mentionner que l'observation des souris dure 16 jours.

Les résultats du nombre de souris mortes par les différentes dilutions de virus lors du test de virulence initiale sont affichés dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2 : Nombres de mortalité des souris inoculées lors du test de virulence initial avant inactivation par le BPL à partir de différentes dilutions

Dilutions	-4	-5	-6	-7	TOTAL	%
S299	10	10	9	ND	29	72.5
S300	10	10	8	2	30	75
S306	9	6	3	5	23	57.5
S308	10	0	1	1	12	30
S309	10	8	5	0	13	32.5
S310	10	10	4	0	24	60
S311	10	10	5	1	26	65
S312	10	10	2	2	24	60
S313	10	10	8	1	29	72.2
S298	10	9	6	1	26	65
S297	10	8	6	1	25	62.5
S292	10	10	8	6	34	85
S291	10	8	9	2	29	72.5
S290	10	9	7	1	27	67.5
S289	10	10	8	2	30	75
S287	10	10	9	3	32	80
S281	10	10	9	5	34	85

Dans le tableau 2, le nombre de souris morte pour chaque dilution est noté ainsi à la fin le nombre total de ses dernières. Aux dilutions -4 et -5 une forte mortalité est observée, les concentrations virales sont plus élevées. La dilution -7 comporte le nombre de mortalité le plus basse car le virus est moins concentré. Le lot S299 n'a pas été dilué à -7. Concernant les lots S306, S292 et S281 une mortalité de souris plus élevé à la dilution -7 comparé aux autres lots. Le nombre total de souris mortes des lots S292, S287 et S281 est plus élevé, ils dépassent les 80% de mortalité. Le lot S308 a connu 0 mortalité lors d'inoculation par la dilution -5. Nous observons que le lot S306 est caractérisé par le taux de mortalité le plus faible qui est de 57.5 %. La moyenne de mortalité de tous les lots étudiés est de 62.5 %.

Les résultats des titres viraux calculés lors du test de virulence initiale sont illustrés dans le tableau 3 :

Tableau 3 : résultats du test de virulence initiale de la matière cérébrale

N°	Quantité de MC	Titre viral DL50
S299		$10^{-6.40}$
S300		$10^{-6.50}$
S306	807	$10^{-5.8}$
S308	829	$10^{-4.0}$
S309	830	$10^{-5.60}$
S310		$10^{-5.90}$
S311		$10^{-6.10}$
S312		$10^{-5.90}$
S313		$10^{-6.30}$
S298	769	$10^{-6.10}$
S297	810	$10^{-6.00}$
S292	774	$10^{-6.90}$
S291	768	$10^{-6.40}$
S290	844	$10^{-6.20}$
S289	825	$10^{-6.50}$
S287	807	$10^{-6.70}$
S281	819	$10^{-6.90}$

D'après le tableau 3, il a été apporté en premier lieu la quantité de matière cérébrale récupérée lors de la récolte, cette dernière varie entre 844g pour le lot S290 et 768g concernant le lot S291. Les poids des lots suivants : S299, S300, S310, S311, S312 et S313 n'ont pas pu être récupérés. La moyenne de matière cérébrale récupérée est de 807g.

En ce qui concerne les titres viraux, il est important d'observer en premier lieu les variations de ces derniers. Nous observons que les titres viraux varient entre $10^{-4.00}$ du lot S308 et $10^{-6.90}$ du lot S292. La moyenne de la DL50 de ces lots est de $10^{-6.13}$.

3. Résultats du test d'activité résiduelle

Une fois le virus contenu dans la matière cérébrale est inactivé par la BPL, le test d'activité résiduelle est appliqué. Pour cela, le virus rabique est inoculé à 20 souris. Une observation de 16 jours est obligatoire pour noter toute manifestation clinique.

Les lots précédents ont tous subis un test d'activité résiduelle (virulence résiduelle) et ils avaient tous une DL50 nulle avec 0% de mortalité.

4. Résultat du test NIH

Comme déjà cité auparavant, le test NIH qui est le test le plus important dans le contrôle du vaccin. Ce test consiste à rechercher la dilution du vaccin à expertiser qui protège 50% des souris vaccinées contre une épreuve virulente donnée. Le virus challenge est dilué à -3.90 et est inoculé à j14 après l'immunisation des souris en j1 et j7 et doit avoir une DL50 comprise entre 5DL50 et 50DL50.

Les résultats du test NIH sont représentés dans le tableau 4. Deux données sont relevées, la dose efficace à 50% du vaccin ainsi que sa valeur antigénique. La DE50 du vaccin de référence dont les souris ont été inoculées varie, car elle est refaite à chaque test de chaque lot. La valeur antigénique de ce dernier est constante.

$$Va \text{ (du vaccin de référence)} = 1.86$$

Tableau 4 : la Présentation des DE50 et des valeurs antigéniques

N° du lot	Titre de vaccin DE50	Titre viral DE50 du vaccin de REF	Valeur antigénique
S299	$10^{-1.63}$	$10^{-2.31}$	0.43
S300	$10^{-1.82}$	$10^{-2.31}$	0.60
S306	$10^{-1.89}$	$10^{-2.31}$	0.71
S308			
S309			
S310			
S311			
S312			
S313			
S298	$10^{-1.68}$	$10^{-2.03}$	0.83
S297	$10^{-1.75}$	$10^{-2.10}$	0.83
S292 avant lyophilisation	$10^{-1.75}$	$10^{-2.35}$	0.46
S292 après lyophilisation	$10^{-1.00}$	$10^{-2.24}$	0.06
S290	$10^{-1.82}$	$10^{-2.52}$	0.37
S291	$10^{-1.89}$	$10^{-2.52}$	0.44
S289	$10^{-2.03}$	$10^{-2.52}$	0.60
S287	$10^{-1.75}$	$10^{-2.31}$	0.51
S281	$10^{-1.47}$	$10^{-1.82}$	0.83

Dans le tableau 4, des variations sont observées entre les DE50, de $10^{-1.00}$ du lot S292 à $10^{-2.03}$ du lot S289. Suite au résultat du lot S292 le résultat n'était pas satisfaisant, un test de NIH d'un échantillon du même lot avant lyophilisation a été appliqué pour connaître la source d'erreur. Nous avons déduit d'après les résultats avant lyophilisation que la problématique réside dans le processus de lyophilisation en considérant le résultat avant cette dernière satisfaisant. Les autres lots n'ont pas connu ce problème.

Concernant les titres du vaccin de référence, malgré une valeur antigénique unique, des légères variations ont été notées entre $10^{-1.82}$ du lot S281 et $10^{-2.52}$ comme valeur minimal de plusieurs lots, le S287, S289, S290 et S291.

Les lots S308, S309, S310, S311, S312 et S313 n'ont pas encore eu leurs tests NIH.

La moyenne des titres du test NIH des vaccins que nous avons expertisés :

$$DE50 = 10^{-1.62}$$

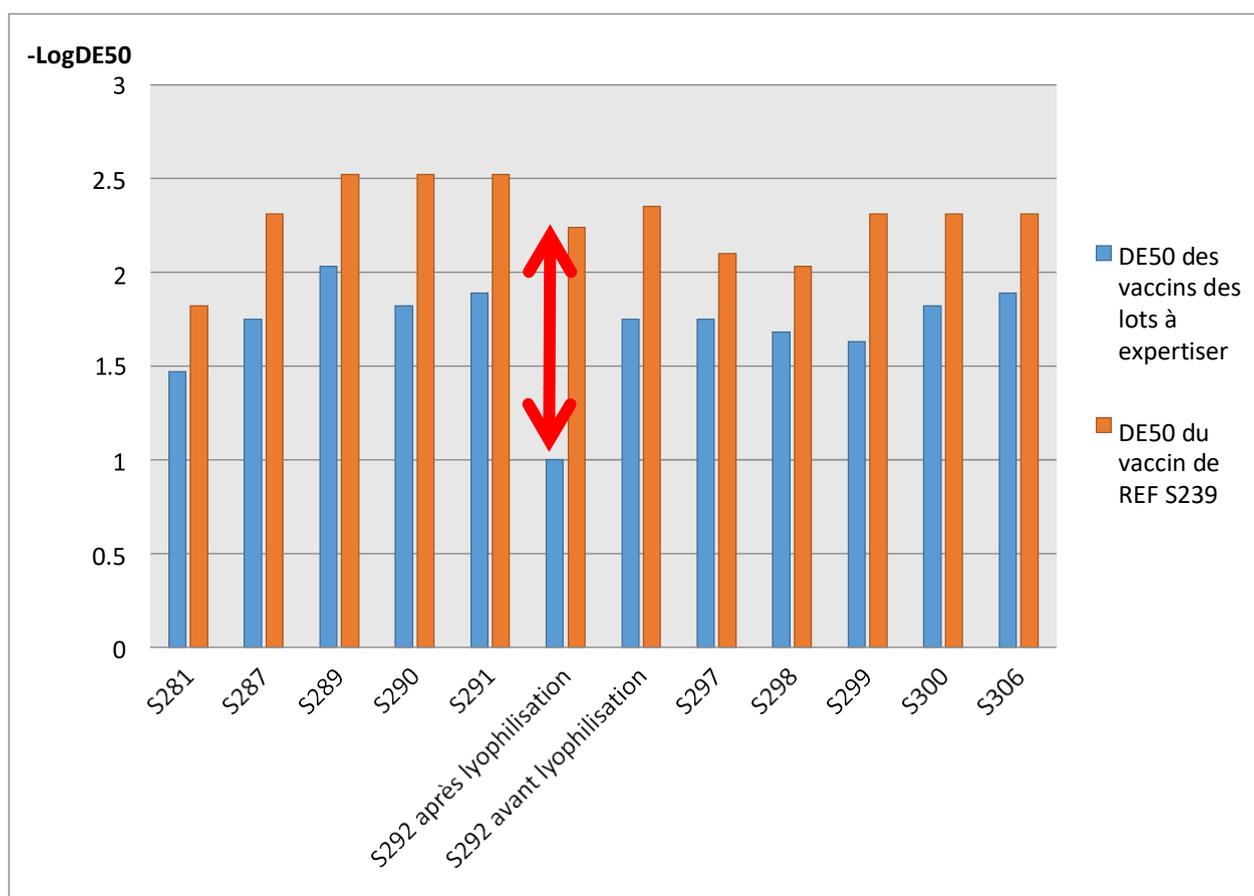


Figure 23 : histogramme 1 des lots à expertiser en fonction de leurs DE50 et la DE50 du vaccin de référence

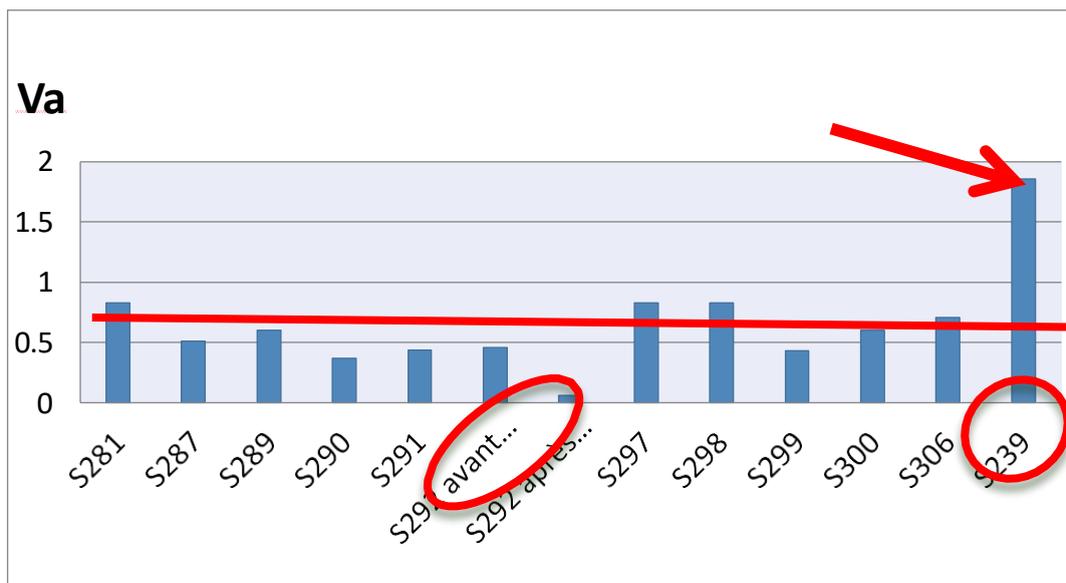


Figure 24: histogramme 2 des lots à expertiser et celui de référence en fonction de leurs valeurs antigéniques.

L’histogramme 1, représente les lots de vaccins à expertiser en fonction de leurs DE50 ainsi la DE50 du vaccin de référence fait parallèlement (la DE50 dans l’histogramme est en $-\log_{10}$ DE50). Nous notons la différence entre ces deux valeurs précédentes et que la plupart des lots se rapproche de la DE50 du vaccin de référence sauf le lot S292.

L’histogramme 2 représente les lots de vaccins à expertiser en fonction de leurs valeurs antigéniques. Le lot S292 est de valeur antigénique la plus basse. Le lot de référence S239 possède la valeur antigénique la plus élevée.

5. Produit fini

Le produit biologique est lyophilisé, conditionné, étiqueté puis conservé et distribué par la suite. Le vaccin antirabique produit dans l'Algérois est nommé RAGIVAC (ND) administré en sous cutané (SC) et en intradermique (ID).



Figure 25: Le vaccin RAGIVAC ND conditionné et étiqueté produit dans l'Algérois à l'Institut Pasteur (IPA). Photo personnelle

Discussion

En premier lieu, il est important de mentionner que le test NIH est valable du fait que parmi les conditions de viabilité, la survie de la majorité des souris ayant la dose la plus concentré du vaccin et la mort de la majorité des souris ayant reçu la dose de vaccin la plus dilué, concernant le vaccin de référence. Pour nos vaccins à expertiser la survie de la majorité des souris ayant reçu la dose la plus élevée suffit pour valider le test NIH. Les résultats de la plupart des lots à expertiser étaient satisfaisants. Les conditions de validité du vaccin au sein de l'institut PASTEUR d'ALGER est le calcul de la valeur antigénique et que cette dernière doit être impérativement au-dessus de 0.3.

Les lots que nous avons expertisés hormis, le lot S292 ont une valeur antigénique supérieure à 0.3 de ce fait ils sont tous valide. Concernant le lot S292, un test NIH avant sa lyophilisation a été appliquée, le résultat de ce dernier était satisfaisant car sa valeur antigénique était supérieure à 0.3. La seule suggestion possible qui pourrait expliquer la baisse de la valeur antigénique après sa lyophilisation est un problème lors de la lyophilisation liée à l'humidité relative lors de ce procédé technologique.

En ce qui concerne les lots restants, il est important de mentionner que la valeur antigénique était inversement proportionnelle à la différence des DE50 des vaccins à expertiser et celle des DE50 des vaccins de référence. Plus cette différence est faible plus la valeur antigénique est élevée.

La variabilité du test NIH, est due premièrement à la variabilité des conditions lors de chaque test. Le manipulateur ainsi que les souris sont aussi considérés comme source de cette variation. Pour limiter cette dernière, toutes les souris sont contrôlées et un seul manipulateur pratique l'inoculation lors de chaque test. Le test NIH comprend plusieurs inconvénients, nous citons le nombre exorbitant de souris utilisé dans un seul test pour chaque lot (plus de 150 souris) ainsi que le temps qu'il consomme et la souffrance animale.

Il aurait été plus intéressant de comparer ces résultats si nous avions fait d'autres types de test d'activité. Des titrages d'anticorps post vaccinaux pour vraiment quantifier la réponse vaccinale de ces vaccins. Des tests in vitro des épitopes immunogènes de la glycoprotéine de la rage fournissent des informations pertinentes sans consommer d'animaux. Le test NIH est un test semi quantitatif dû au nombre de dilution pratiqué mais surtout c'est un test qualitatif (protégé/non protégé) où les souris qui survivent représente des souris immunisées contre la

rage. Le test NIH reste le seul test réglementé d'après L'OMS concernant le vaccin rabique humain.

D'après nos résultats issus des tests de virulence initiale, les matières cérébrales des lots expertisés sont bien actives. Après traitement à la bêta propriolactone, le test de virulence résiduelle indique la disparition des effets virulents, et qui n'ont à aucun moment provoquer la mort (la maladie) aux souris inoculées. Cela démontre clairement l'efficacité de la BPL sur le virus rabique.

La variabilité des DL50 peut être expliquée par la variabilité de la quantité de la matière cérébrale récoltée. Cette dernière connaît seulement de légère variation et d'après nos constatations, elle n'a aucune influence. Le facteur influençant est la multiplication virale du virus fixe, car il ne faut pas oublier que le virus est cultivé sur un tissu vivant (cerveaux de souris). Il aurait été intéressant de comparer ces résultats en utilisant bien évidant la même souche issue du même cerveau de lapin qui est au 21ème passage avec d'autre méthode de culture viral, comme les cellules VERO afin d'étudier la variabilité de la DL50 du virus rabique.

Il est néanmoins important de rappeler que le test d'activité résiduelle, doit donner comme résultat 0% de mortalité après inoculation du virus après son inactivation au BPL.

Le β -propriolactone est largement utilisée pour la production de vaccins viraux inactivés, pas que celui de la rage mais aussi contre la grippe. D'autre inactivateur sont utilisés comme l'éthylénimine binaire BEI pour inactiver le « foot-and-mouth disease virus » virus de la fièvre aphteuse. Une étude avait montré l'effet inactivateur et l'implication dans la réponse vaccinale du BPL, BEI et le formol sur le virus de la gastroentérite transmissible qui est fatale pour les porcines et la vaccination est la seule mesure de contrôle contre cette maladie (Zhao et al. 2020).

Leur résultat a montré que les trois groupes expérimentaux peuvent induire une réponse humorale et cellulaire (l'inactivation devrait ne pas affecter l'immunogénicité de l'antigène viral). Le groupe qui a subis une inactivation au formol avait une meilleure réponse humorale par un pic plus élevé en IgG. Cependant le groupe inactivé par le BEI avait montré une excellente réponse cellulaire (Zhao et al. 2020).

Le choix de l'inactivateur n'est pas au hasard, plusieurs tests et recherches sont faits préalablement, concernant le BPL qui donne de bon résultat d'inactivation concernant la rage

et le virus de la grippe. Le formol quant à lui malgré la bonne réponse humorale (l'IgG est un indicateur important dans l'évaluation du vaccin) son potentiel d'inactivation était médiocre sur le NDV (New Castle Disease Virus) comparé à l'inactivation au BPL (ZHAO *et al.* 2020).

Le formol à même était prouvé abrasif et altère des sites antigéniques sur la capsid du Poliovirus. L'institut des vaccins des pays bas (NVI) a démontré le BPL comme alternative possible à l'inactivation du Poliovirus avec un potentiel immunogène plus important que du Poliovirus inactivé par le formol (STEPHEN L. CORHI 2009, s. d.).

À l'IPA comme nous avons démontré auparavant, l'inactivation du virus se fait par le BPL qui est surveillée par des points de contrôle qui sont représentés par des tests de virulence résiduelle et initial

La préparation des vaccins antirabiques a été longtemps étudiée afin d'évoluer la méthode, cela implique : une meilleure immunisation, un faible risque d'infection et surtout pas de réactions secondaires non désirées de type encéphalitique. La méthode classique implique l'utilisation de souriceaux qui est utilisée en Algérie au sein de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA). Dans le monde, plusieurs autres techniques sont en cours d'évolution notamment la culture cellulaire à base de cellules fibroblastiques de bovin ou de canard ou bien de différentes autres espèces. L'utilisation même de cellule embryonnaire de poumon humain. Le vaccin préparé sur cerveau de souriceau nouveau-né a encore une place privilégiée, tant par sa bonne tolérance que par son coût. Il est important de noter, que l'utilisation des souriceaux est privilégiée par l'absence de myéline dans les fibres nerveuses contrairement à des souris adultes. Il est important de savoir que la myéline favorise l'infection et aide le virus dans son cheminement vers le système nerveux central. Le but est de seulement produire une grande quantité de virus et à favoriser sa multiplication sans endommager les tissus. Cependant, le vaccin préparé à partir de tissu cérébral, encore utilisé dans les pays en voie de développement, est encéphalitique à cause de la présence de myéline et d'impuretés dans les préparations. D'où l'utilisation des cellules non nerveuses comme les cellules embryonnaires de bovin ou de poulet, des fibroblastes humains ou des cellules rénales de bovin. La culture cellulaire représente une source virale pure et stable avec une utilisation moindre des animaux de laboratoire (LOUCQ *et al.* 1985).

Le coût élevé et le manque d'expérience avec les cultures cellulaires représente des inconvénients qui empêchent l'Algérie d'en produire les vaccins à base de culture Véro.

L'utilisation des souriceaux réduit le risque de virulence dû à la myéline et l'inexistence des facteurs encéphalotogène dans l'encéphale.

Concernant les excipients contenus dans les vaccins, ils comprennent essentiellement des conservateurs (mercurothiolate dans le cas de vaccin antirabique à l'IPA) ou des stabilisants de nature soit glucidique (saccharose ou lactose), ou protidique comme des acides aminés (glycine, acide glutamique), ou des protéines (albumine humaine ou recombinante, gélatine de veau (faut qu'il soit indemne d'ESB, ou de porc (faut qu'il soit un indemne d'un certain cancer)). Les différents stabilisants ajoutés dans les vaccins visent à éviter la dénaturation de l'antigène lors de l'étape de lyophilisation ou en cas d'exposition à la chaleur. La quantité d'antigène contenu dans un vaccin peut être extrêmement petit, de l'ordre d'une dizaine de microgrammes ou moins, En absence d'excipient, l'antigène ne serait pas récupérable et adhérerait aux parois des flacons.

La vaccination humaine étant très importante, celle des animaux l'est encore plus, vu la proportion de cas humain dû aux morsures de chien (première source de la rage humain).

La proportion d'animaux vaccinés dépend souvent, de la bonne volonté des propriétaires, qui varie selon la gravité de la situation épidémiologique locale (zones urbaine ou rural), l'étendue des incitations, de l'efficacité économique de la vaccination et de la qualité de l'information du public qui est très négligé en Algérie.

Une législation efficace devrait intégrer les éléments suivants, par ordre de priorité décroissante. Protéger les zones indemnes de maladies contre l'infection des zones infectées (en vaccinant animaux en transit). Protéger les espèces les plus dangereuses pour l'homme (chiens, chats et bovins). Protéger les animaux à haut risque ou à valeur économique considérable (bovins, chevaux, précieux reproducteurs de toutes les espèces). Cependant, ce sont souvent les animaux les plus à risque qui reçoivent le moins d'attention (ex : chiens de garde, chats de ferme, bétail en élevage extensif) et qui, par conséquent, paient le plus lourd tribut à la rage (BLANCOU, s. d.).

La vaccination des animaux sauvages contre la rage par voie orale est actuellement appliquée uniquement sur le renard roux européen. En Algérie, la proportion d'animaux sauvage qui sont concerné dans la transmission du virus rabique est très peu documentée et très négligé. Expérience acquise au cours des douze dernières années en France, Suisse, et plus tard la Belgique et l'Italie ont montré que seuls les vaccins vivants sont efficaces lorsqu'ils sont

administrés au moyen d'appâts, à condition qu'ils aient un titre minimum de 107 unités infectieuses par ml. L'innocuité de ces vaccins dépend sur la souche de virus, les souches les plus fréquemment utilisées étant l'ERA standard. Comme pour les animaux domestiques, le but de ces vaccinations est de réduire l'incidence de la rage avant qu'elle n'atteigne l'homme et, si possible, supprimer la source du virus dans la faune sauvage (BLANCOU, s. d.)

Les 3 générations de vaccins développés que nous avons étudié au cours de notre partie bibliographique présentent des avantages ainsi que des inconvénients qui influent le choix du vaccin produit ou commercialisé connaître ses points est primordiale si l'Algérie envisage une évolution concernant la production des différents vaccins antirabique. Pour la première génération leur coût faible présente l'avantage principale néanmoins des inconvénients tels des complications neurologiques (encéphalomyélite, polynévrite) et des réactions allergiques se manifestent souvent. La deuxième génération permet une production à grande échelle de vaccins. Cependant cette dernière nécessite l'utilisation de sérum animal de haute qualité et coûteux ce qui augmente le coût de la production de vaccins, en outre la variation importante entre les lots de culture et le risque de contamination durant ce processus de fabrication représentent les principaux problèmes. La troisième génération permet de produire un vaccin plus sûr car aucun virus vivant de la rage n'est utilisé dans sa production. Ces vaccins peuvent être administrés par voie orale et sont donc principalement utilisés chez les animaux sauvages, de plus ils augmentent l'ampleur et la durée de la réponse immunitaire. Malgré cela les données scientifiques sont toujours incomplètes sur l'efficacité et les effets secondaires de ce type de vaccin, les vecteurs peuvent provoquer des maladies chez les animaux inoculés et les humains et des mutations pourraient survenir dans des gènes insérés et ainsi restaurer la virulence de la rage.

Nos visites à l'IPA, nous ont initiées grandement à une chaîne d'industrie médicale très importante. La fabrication d'un vaccin est loin d'être négligé, car son premier but est de prévenir une maladie. Si d'une façon ou d'une autre, des effets secondaires se manifestent le vaccin perd toute crédibilité surtout si dans notre cas le virus de la rage ne pardonne pas, des vies sont mis en jeu en cas d'échec dans une étape de production ou de contrôle.

En ce qui concerne les voies d'administrations des vaccins, les études ont bien montré que la voie d'administration a un grand impact dans la réponse immunitaire. Le nombre de cellules présentatrice d'antigène (CPA) et la composition du tissu où se fait l'injection du vaccin peut avoir un rôle dans la réponse vaccinal.

Pour l'instant deux voies d'administration étaient étudiées concernant les vaccins antirabiques : la voie intramusculaire (c'est la voie utilisée en Algérie) et la voie intradermique (qui représente une voie très immunogène). Ce n'est pas le seul avantage, en intramusculaire (IM) l'administration nécessite un flacon entier, alors que l'administration de l'ID nécessite une fraction. Ça permettra d'accroître la disponibilité et de baisser le coût de vaccination. La prophylaxie post-exposition par ID a été rapportée pour permettre une réduction des coûts de vaccination de 60 à 80% par rapport à un calendrier IM avec le même vaccin (DENIS et *al.* 2019).

Quand est-il de la voie intraveineuse, le vétérinaire Gauthier l'avait utilisée pour immuniser des moutons en injectant du virus vivant par voie veineuse puis inoculer le virus rabique par sa voie naturelle (les tissus musculaires près des terminaisons nerveuses). L. Pasteur avait utilisé le même procédé sur des chiens mais tous les chiens étaient morts. La déduction que Mr. Pasteur a tirée, c'est l'incapacité d'immuniser par voie sanguine due au tropisme nerveux du virus et à la virémie qui est soit transitoire ou même absente. Depuis, aucune étude n'a vu le jour concernant ce chapitre.

Conclusion et perspective :

L'Algérie est un pays endémique à la rage, plus de 15 cas de décès par ans sont déclarés au niveau du territoire national. Une maladie ou aucun cas devrait être toléré. Malgré cela le mot rage fait plus référence à un état d'esprit qu'une maladie mortelle dans la culture Algérienne. Cela implique un manque de sensibilité considérable. Nous avons suite à cela décidé de travailler sur le vaccin humain du virus de la rage afin d'exposer le procédé de sa fabrication ainsi que de donner ses valeurs usuelles.

Notre étude décrit clairement un procédé de fabrication du vaccin antirabique. Parmi les multitudes procédées de fabrication des vaccins, l'Algérie utilise toujours la technique de base proposée par Fuenzalida et Palacios en 1955. Depuis, cette date et grâce aux avancés dans les sciences médicale, pharmaceutiques et ceux concernant la biotechnologie la production de vaccin a connu une amélioration spectaculaire surtout concernant les vaccins recombinants.

Cette méthode utilisée à l'IPA consiste à cultiver le virus sur cerveaux de souris. L'inactivation du virus se fait grâce à la beta propriolactone qui jusqu'à présent à donner de très bon résultat comparé à son prédécesseur le phénol. Le vaccin antirabique est titré par le test NIH qui montre malgré sa variabilité et ses inconvénients reste le seul test réglementé par l'OMS concernant le vaccin rabique humain. Nos résultats suite à ce test fut satisfaisant ou même lors d'un éventuel accident ou problème les échantillons pris dans chaque étape permette un meilleur contrôle de la qualité cela en ce qui concerne le lotS292. Le vaccin est stabilisé par le merthiolate et le saccharose est utilisé pour des fins technologiques pour lyophiliser le vaccin.

L'IPA nous a ouvert ses portes pour étudier la production des moyennes biologiques de lutte contre la rage. Une perspective peut être lointaine mais des plus intéressantes serait une étude comparative entre le procédé de fabrication en Algérie et des autres laboratoires à travers le monde, nous aurions aimé utiliser différent type de test d'activité et de cultiver le virus dans des cellules non nerveuse. Une étude comparative de d'autre agent d'inactivation et d'étudier les variabilités qui peuvent engendrer sur le virus rabique.

Annexes :

Annexe 1 : Valeurs numériques pour calculer les titres (facteur de dilution = 10)

4	0.50				
5	0.75	0.5			
6	1.00	0.7	0.50		
7	1.25	0.9	0.67		
8	1.50	1.1	0.83	0.50	
9	1.75	1.3	1.00	0.63	
10	2.00	1.5	1.17	0.75	0.5
11	2.25	1.7	1.33	0.88	0.6
12	2.50	1.9	1.50	1.00	0.7
13	2.75	2.1	1.67	1.13	0.8
14	3.00	2.3	1.83	1.25	0.9
15	3.25	2.5	2.00	1.33	1.0
16	3.50	2.7	2.17	1.50	1.1
17	3.75	2.9	2.33	1.63	1.2
18	4.00	3.1	2.50	1.75	1.3
19	4.25	3.3	2.67	1.88	1.4
20	4.50	3.5	2.83	2.00	1.5
21	4.75	3.7	3.00	2.13	1.6
22	5.00	3.9	3.17	2.25	1.7
23	5.25	4.1	3.33	2.38	1.8
24	5.50	4.3	3.50	2.50	1.9
25	5.75	4.5	3.67	2.63	2.0
26		4.7	3.83	2.75	2.1
27	for each	4.9	4.00	2.88	2.2
28	further	5.1	4.17	3.00	2.3
29	positive	5.3	4.33	3.13	2.4
30	animal	5.5	4.50	3.25	2.5
	add 0.25				
31		for each	4.67	3.38	2.6
32		further	4.83	3.50	2.7
33		positive	5.00	3.63	2.8
34		animal	5.17	3.75	2.9
35		add 0.2	5.33	3.88	3.0
36				4.00	3.1
37			for each	4.13	3.2
38			further	4.25	3.3
39			positive	4.38	3.4
40			animal	4.50	3.5
			add 0.167		
41				for each	3.6
42				further	3.7
43				positive	3.8
				animal	3.9
				add 0.125	

Annexe 2 : Valeurs numériques pour calculer les titres (facteur de dilution 2 et 5)

TABLE 3. NUMERICAL VALUES FOR CALCULATION OF TITRES:
DILUTION FACTOR = 2

Total no. of positive animals	No. of inoculated animals per dilution			
	n = 4	n = 5	n = 6	n = 10
4	0.15	0.15	0.15	0.15
5	0.23	0.21	0.15	0.15
6	0.30	0.27	0.20	0.15
7	0.38	0.33	0.25	0.20
8	0.45	0.39	0.30	0.25
9	0.53	0.45	0.35	0.30
10	0.60	0.51	0.40	0.35
11	0.68	0.57	0.45	0.40
12	0.75	0.63	0.50	0.45
13	0.83	0.69	0.55	0.50
14	0.90	0.75	0.60	0.55
15	0.98	0.81	0.65	0.60
16	1.05	0.87	0.70	0.65
17	1.13	0.93	0.75	0.70
18	1.20	0.99	0.80	0.75
19	1.28	1.05	0.85	0.80
20	1.35	1.11	0.90	0.85
21	1.43	1.17	0.95	0.90
22	1.51	1.23	1.00	0.95
23	1.58	1.29	1.05	1.00
24	1.65	1.35	1.10	1.05
25	1.73	1.41	1.15	1.10
26	1.81	1.48	1.20	1.15
27	1.88	1.54	1.25	1.20
28	1.96	1.60	1.30	1.25
29	2.03	1.66	1.35	1.30
30	2.11	1.72	1.40	1.35
31	2.19	1.78	1.45	1.40
32	2.27	1.84	1.51	1.45
33	2.35	1.90	1.56	1.50
34	2.43	1.96	1.61	1.55
35	2.51	2.02	1.66	1.60
36	2.59	2.08	1.71	1.65
37	2.67	2.14	1.76	1.70
38	2.75	2.20	1.81	1.75
39	2.83	2.26	1.86	1.80
40	2.91	2.32	1.91	1.85

TABLE 4. NUMERICAL VALUES FOR CALCULATION OF TITRES:
DILUTION FACTOR = 5

Total no. of positive animals	No. of inoculated animals per dilution			
	n = 4	n = 5	n = 6	n = 10
4	0.35	0.35	0.35	0.35
5	0.52	0.49	0.35	0.35
6	0.70	0.63	0.47	0.35
7	0.87	0.77	0.58	0.40
8	1.05	0.91	0.70	0.45
9	1.22	1.05	0.82	0.50
10	1.40	1.19	0.93	0.55
11	1.57	1.33	1.05	0.60
12	1.75	1.47	1.16	0.65
13	1.92	1.61	1.28	0.70
14	2.10	1.75	1.40	0.75
15	2.27	1.89	1.51	0.80
16	2.45	2.03	1.63	0.85
17	2.62	2.17	1.75	0.90
18	2.80	2.31	1.86	0.95
19	2.97	2.45	1.98	1.00
20	3.15	2.59	2.10	1.05
21	3.33	2.73	2.21	1.10
22	3.51	2.87	2.33	1.15
23	3.69	3.01	2.45	1.20
24	3.87	3.15	2.56	1.25
25	4.05	3.29	2.68	1.30
26	4.23	3.42	2.80	1.35
27	4.41	3.56	2.91	1.40
28	4.59	3.70	3.03	1.45
29	4.77	3.84	3.15	1.50
30	4.95	3.98	3.28	1.55
31	5.13	4.12	3.40	1.60
32	5.31	4.26	3.52	1.65
33	5.49	4.40	3.64	1.70
34	5.67	4.54	3.76	1.75
35	5.85	4.68	3.88	1.80
36	6.03	4.82	4.00	1.85
37	6.21	4.96	4.12	1.90
38	6.39	5.10	4.24	1.95
39	6.57	5.24	4.36	2.00
40	6.75	5.38	4.48	2.05

Références bibliographiques

A

Abbas, Abul K., Andrew H. Lichtman, et Shiv Pillai. 2016. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. Fifth edition. St. Louis, Missouri: Elsevier.

Abelseth, M. K. (1964). An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. *The Canadian Veterinary Journal*, 5((11)), 279-286.

Adamdaniel. 2011. « Virus à ARN (2) Virus de La Rage Virus de La Grippe ». SlideServe. 16 novembre 2011. <https://www.slideserve.com/adamdaniel/virus-arn-2-virus-de-la-rage-virus-de-la-grippe>.

Alan C. Jackson (Eds.) *Advances in Virus Research 79 - Research Advances in Rabies-* Academic Press (2011)

« **ATCC: The Global Bioresource Center** ». s. d. Consulté le 6 novembre 2020. https://www.atcc.org/default.aspx?geo_country=us.

Aubry, P et Rotivel, Y 2001. *Rage*. EMC (Editions Scientifiques et Médicale Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Maladies infectieuses), 8-065-C-10. 16p

B

Birhane MG et al. 2015. Rabies surveillance in the United States during J Am Vet Med Assoc. 2017; 250(10):1117–1130.

Bourhy, H., May, T., Morer, I., Ribadeau-Dumas, F., Strady, C., 2013. Vaccination antirabique préventive, traitement post-exposition et suivi sérologique des personnes régulièrement exposé au virus de la rage (voyageurs, professionnels, chiroptérologues). Rapport. Haut conseil de la santé publique. Paris. 32p.

Bourhy, H., May, T., Morer, I., Ribadeau-Dumas, F., Strady, C., 2013. Vaccination antirabique préventive, traitement post-exposition et suivi sérologique des personnes régulièrement exposé au virus de la rage (voyageurs, professionnels, chiroptérologues). Rapport. Haut conseil de la santé publique. Paris. 32p.

Brochier, B., Kieny, M. P., Costy, F., Coppens, P., Bauduin, B., Lecocq, J. P., . . .

.Pastoret, P. P. (1991). Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia rabies vaccine. *Nature*, 354(6354), 520-522. doi:10.1038/354520a0

C

Collard, L., 2006. Apport de la biologie moléculaire à la taxinomie et à l'épidémiologie des virus rabiques. Thèse de doctorat : faculté de médecine de Créteil. 186p.

D

Dacheux L, Reynes JM, Buchy P, Sivuth O, Diop BM, et al. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin Infect Dis* 2008 ; 47:1410-7

Dao, S., Abdillahi, A.M., Bougoudogo F., Toure, K, Simbe, C., 2006. Aspects épidémiologiques de la rage humaine et animale en milieu urbain à Bamako, Mali. *Bull Soc Pathol Exot* ; 99(3) :183–6.

E

Eylar, E. H., Salk, J., Beveridge, G. C., & Brown, L. V. (1969). Experimental allergic encephalomyelitis: An encephalitogenic basic protein from bovine myelin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 132(1), 34-48. doi:10.1016/0003-9861(69)90336-1

F

Fenje, P. (1960). Propagation of rabies virus in cultures of hamster kidney cells. *Canadian Journal of Microbiology*, 6(5), 480-484.

G

Garg, Sudhi Ranjan. 2014. *Rabies in Man and Animals*. New Delhi: Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1605-6>.

Stephen L. Corhi GPEI-Winter 2009, No.3 ». Consulté le 29 octobre 2020.

<http://polioeradication.org/tools-and-library/current-research-areas/polio-pipeline/winter-2009-no-3/>.

H

Hampson K et al. 2015 :Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. *Trop Dis.*; 9 (5):e0003786

<http://www.mesvaccins.net/>. Consulté le 23 octobre 2020.

Hudson LC, Weinstock D, Jordan T, Bold-Fletcher NO (1996b): Clinical presentation of experimentally induced rabies in cattle and sheep. *ZentralblVeterinarmed B* 43:85–95

humanlife. 2019. « KhonKaen District Has a Rabies Scare ». *Human Life* (blog). 22 mars 2019. <https://humanlife.asia/khon-kaen-rabies-scare/>.

WHO fact sheet on rabies.<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>, accessed March 2018.

J

Jackson, Alan C., éd. 2013. *Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management*. Third edition. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press.

Jervis, G. A. (1954). Experimental allergic encephalitis in animals, and its bearing upon the etiology of neuroparalytic accidents following antirabies treatment in man. *Bulletin of the World Health Organization*, 10(5), 837-84

Jones, N.O. and Feldman, 1981. B-propiolactone (Betaprone). A Monograph on its Uses, Maryland Heights, MO., USA.

K

Kallel, H., Jouini, A., Majoul, S., & Rourou, S. (2002). Evaluation of various serum and animal protein free media for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells. *Journal of Biotechnology*, 95(3), 195-204. doi:10.1016/S0168-1656(02)00009-3

Kardjadj, Moustafa, et Meriem Hind Ben-Mahdi. 2019. « Epidemiology of dog-mediated zoonotic diseases in Algeria: a One Health control approach ». *New Microbes and New Infections* 28 (janvier): 17-20. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.01.001>.

King, A.M., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), 2012. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

Kissling, R. E. (1958). Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 98(2), 223- 225. doi:10.3181/00379727- 98-23997

L

« **laboratoire des vaccins et sérums antirabiques** ». Consulté le 9 février 2020. http://www.sante.dz/ipa/vaccinantirabique.htm?fbclid=IwAR2Yek6vOLrmLSRrIWaluUv_ZFFujmsH11GIKq-IV9C_c7EWzoybIbH2sXs.

« **La rage** ». Consulté le 20 juillet 2020. <http://la.rage.free.fr/travail.php>.

Loucq, C., J. P. Albert, Ph. Michel, T. O. Harry, P. Rollin, et P. Sureau. 1985. « Essais Cliniques du Vaccin Rabique Préparé sur Culture de Cellules Renales de Foetus Bovin et du «**Vaccin Rabique Préparé sur Cerveau de Souriceau Nouveau-Né** ». In *Rabies in the Tropics*, édité par Ernst Kuwert, Charles Mérieux, Hilary Koprowski, et Konrad Bögel, 147-52. Berlin, Heidelberg : Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70060-6_21.

« **Lyssavirus ~ ViralZone page** ».s. d. Consulté le 29 octobre 2020. <https://viralzone.expasy.org/22>

M

Meslin, F.-X., Kaplan, M. M., Koprowski, H., & Organization, W. H. (1996). *Laboratory techniques in rabies*. WHO.

Minke, J. M., Audonnet, J. C., & Fischer, L. (2004). Equine viral vaccines: The past, present and future. *Veterinary Research*, 35(4), 425-443. doi:10.1051/vetres:2004019

« **Monoclonal Horse Antibody Production - CreativeBiolabs** ». s. d.Consulté le 9 février 2020. <https://www.creative-biolabs.com/monoclonal-horse-antibody-production.html>.

N

Nandi, S., & Kumar, M. (2010).Development in immunoprophylaxis against rabies for animals and humans. *Avicenna Journal of MedicalBiotechnology*, 2(1), 3-21.

NCEZID, s. d. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of High-Consequence Pathogens and Pathology (DHCPP)

O

OIE. (2013). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009. OIE (World organisation for animal health)

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_index.htm

P

Palanisamy, R., Ramanna, B. C., Rao, K. A., & Srinivasan, V. A. (1992). Combined vaccination of cattle against FMD and rabies. *Microbiologica*, 15(1), 45-50.

Pay, T. W. F., Boge, A., Menard, F., & Radlett, P. J. (1985). Production of rabies vaccine by an industrial scale BHK 21 suspension cell culture process. *Developments in Biological Standardization*, 60, 171-174.

Peck, F. B., Powell, H. M., & Culbertson, C. G. (1955). A new antirabies vaccine for human use. *Journal of Laboratory and ClinicalMedicine*, 45(5), 679-683.

Perez, O., &Paolazzi, C. C. (1997). Production methods for rabies vaccine. *Journal of IndustrialMicrobiology&Biotechnology*, 18(5), 340-347. doi:10.1038/sj.jim.2900391

Picard, J et al. 2012.Guide d'intervention visant la prévention de la rage humaine. La direction descommunications du ministère de la santé et des services sociaux. Québec. 219p.

Pierre SUREAU, « RAGE », Encyclopædia Universalis consulté le 31 octobre 2019. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/rage/>

Pr Anne Decoster, le Dr Jean-Claude Lemahieu (Faculté Libre de médecine de Lille), et le Pr Hélène Peigue-Lafeuille (Faculté de médecine de Clermont Ferrand).

R

Rabies diagnosis <https://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/histologic.html>

« Rabies ». s. d. Consulté le 23 octobre 2019. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/rabies>

Rabies vaccines and immunoglobulins
WHO https://www.who.int/immunization/policy/position_papers/pp_rabies_summary_2018.pdf

Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2007) Veterinary medicine – a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats, 10th edn. Saunders-Elsevier, Edinburgh.

« **Rage animale : surveillance et contrôle** ». s. d. Consulté le 23 octobre 2020. <https://www.quebec.ca/agriculture-environnement-et-ressources-naturelles/sante-animale/maladies-animales/rage-chez-les-animaux/operations-de-surveillance-de-la-rage-du-raton-laveur/>

« **Rhabdoviridae** ». s. d. Consulté le 24 octobre 2019. http://www.microbes-edu.org/etudiant/rhabdoviridae.html?fbclid=IwAR29DL50Ep2uQEAbM_gYGkhShYBQarnindqSISlmko74yzLyTbGmhpObcQ4

Rodrigues da Silva et al. 2000. Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines. Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo, 42(2), 95-98. doi:10.1590/S0036-46652000000200006

Rupprecht CE et al. 2016. Current Status and Development of Vaccines and Other Biologics for Human Rabies Prevention. Expert Rev Vaccines. 2016;15(6):731–749.

S

Shelke, P.V., et PunitRachh. 2019. « Equine Rabies Immunoglobulin: A Review ». *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 9 (août): 730-35. <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i4-s.3388>.

Sugiyama, M., & Ito, N. (2007). Control of rabies: Epidemiology of rabies in Asia and development of new-generation vaccines for rabies. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 30(5-6), 273-286. doi:10.1016/j.cimid.2007.05.007

Sureau, P. (1987). Rabies vaccine production in animal cell cultures. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 34, 111-128.

T

Tarantola A. 2017 Four Thousand Years of Concepts Relating to Rabies in Animals and Humans, Its Prevention and Its Cure. *Trop Med Infect Dis*.

Tiembrè, I. et al. 2010. Observance du traitement vaccinal antirabique chez les sujets exposés à la rage à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Santé publique*, volume 21, (6), 595-603.

« **TPE La rage** ». s. d. Consulté le 23 octobre 2020. <http://tpe-1s-la-rage.e-monsite.com/>.

Trejos, A., Lewis, V., Fuenzalida, E., & Larghi, O. (1974). Laboratory investigations of neuroparalytic accidents associated with suckling mouse brain rabies vaccine I: Encephalitogenicity and virological studies. *Ann. Immunol.(Inst. Pasteur)*(6), 917-924.

« **Troisième époque : 1877 - 1887** ». Institut Pasteur. <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/notre-histoire/troisieme-epoque-1877-1887>.

Tuffereau, C., Leblois, H., Bénéjean, J., Coulon, P., Lafay, F., & Flamand, A. (1989). Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology*, 172(1), 206-212. doi:10.1016/0042-6822(89)90122-0

U

Umeno, S. (1921). A study on the antirabic inoculation of dogs, and the results of its practical application. *Kitasato Archives of Experimental Medicine*, 4(2), 89-108

V

« **Vaccins : les points essentiels** ». s. d. Consulté le 17 novembre 2020.

<https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/vaccins-les-points-essentiels>.

Viral zoonoses slide set<https://virology-online.com/viruses/Rhabdoviruses5.htm>

W

Wang, Y. J., Xiang, Z. Q., Pasquini, S., & Ertl, H. C. J. (1998). Effect of passive immunization or maternally transferred immunity on the antibody response to a genetic vaccine to rabies virus. *Journal of Virology*, 72(3), 1790-1796

« **WHO | Other rabies biological products** ». s. d. WHO. World Health Organization. Consulté le 20 octobre 2020

https://www.who.int/rabies/resources/other_rabies_biolog_product/en/.

Z

Zhao et al. 2020. « Assessments of different inactivating reagents in formulating transmissible gastroenteritis virus vaccine ». *Virology Journal* 17 (octobre). <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01433-8>