

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

Adaptation du poxvirus (la souche vaccinale RM65) Sur la lignée cellulaire BSR

Présenté par :

FARHANI Sara

Soutenu le : 11 / 09 / 2019

Devant le jury composé de :

- | | | |
|------------------|-------------|------|
| - Président : | HAMDI TM | ENSV |
| - Promoteur : | GOUCEM R | ENSV |
| - Co-promoteur : | BOUBGUIRA A | IPA |
| - Examineur 1 : | BOUAYAD L | ENSV |
| - Examineur 2 : | BOUHAMED R | ENSV |

Année universitaire : 2018/2019

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

Je désire exprimer ma profonde gratitude à Monsieur GOUCEM Rachid pour avoir accepté de m'encadrer, et Docteur BOUBGUIRA Abderrahmane pour avoir accepté de m'accueillir au sein du laboratoire de production et de développement des vaccins viraux vétérinaires, I.P.A. Kouba, pour leur orientation, leur suivi sérieux et régulier, leur disponibilité et bienveillance remarquables... Merci pour tout.

A Monsieur HAMDI Taha Mossadak, Professeur à l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse, hommage respectueux.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury Dr BOUHAMED R. et Dr BOUAYAD L., pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre mémoire, en acceptant d'examiner mon travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Je remercie l'Institut Pasteur d'Algérie d'avoir accepté de m'autoriser à réaliser mon stage de fin d'études au sein du service de production et de développement des vaccins viraux vétérinaires, annexe de Kouba. Je tiens à remercier l'équipe du laboratoire, BELMESSABIH Nassira Soumaya, SAÂDA Naïm, HAMIDOUCHE Mohamed, qui ont accepté de répondre à toutes mes questions avec gentillesse.

Enfin, que tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, trouvent, par le biais de ces remerciements, l'expression de mon respect le plus profond.

À vous tous, je vous dis du fond du cœur Merci.

DEDICACES

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

A mes frères (Mohammed el Amin, Houssam, Aymen, Abdelwaheb)

Et ma chère sœur (Manar)

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

A ma sœur jiji merci pour ton aide

A missa pour son soutien et ses encouragements qu'Allah te protège ma

Chérie.

A ichrak Je te remercie chérie pour tes conseils et ton aide

A tous mes camarades de l'ENSV et futurs collègues

Merci pour ces cinq années.

Table des matières

Etude bibliographique

I. Étude clinique de la clavelée

I.1.	Définition.....	01
I.2.	Symptomatologie.....	01
I.3.	Lésions.....	02
I.4.	Diagnostic.....	05
I.4.1.	Diagnostic clinique.....	05
I.4.2.	Diagnostic différentiel.....	05
I.4.3.	Diagnostic expérimental.....	06
I.5.	Prophylaxie.....	06
I.5.1.	Prophylaxie sanitaire.....	06
I.5.2.	Prophylaxie médicale.....	07
I.6.	Législation sanitaire.....	07
I.6.1.	Pays indemne de clavelée et de variole caprine.....	07
I.6.2.	Zone infectée par la clavelée.....	08

II. Etude épidémiologique de la clavelée

II.1.	Historique.....	09
II.2.	Importance.....	09
II.3.	Espèces affectées.....	09
II.4.	Répartition géographique de la maladie.....	10
II.5.	Agent pathogène.....	10
II.5.1.	Morphologie et structure du virus.....	10
II.5.2.	Propriétés physico-chimiques.....	11
II.5.3.	Propriétés biologiques.....	12
II.5.3.1.	Culture in vivo.....	12
II.5.3.2.	Culture in ovo.....	12
II.5.3.3.	Culture in vitro.....	12
II.5.4.	Pouvoir immunogène.....	12
II.6.	Épidémiologie.....	13
II.6.1.	Analytique.....	13
II.6.2.	Synthétique.....	14
II.7.	Impact économique de la clavelée.....	14
II.8.	Différentes souches du virus claveloux dans le monde.....	14

III.	Vaccins et vaccination anti-claveleuse	
III.1.	Définition et principe de la vaccination.....	16
III.2.	Histoire.....	16
III.3.	Objectifs de la vaccination.....	16
III.4.	Types de vaccins.....	17
III.4.1.	Vaccins vivants atténués.....	17
III.4.2.	Vaccins inactivés.....	17
III.4.3.	Vaccins synthétiques.....	18
III.5.	Culture cellulaire.....	18
III.5.1.	Différents types de lignées cellulaires.....	18
III.5.1.1.	Culture primaire.....	18
III.5.1.2.	Cellules de lignée immortelles.....	19
III.6.	Vaccin anti-claveleux produit par l'Institut Pasteur d'Algérie.....	21
III.6.1.	Historique.....	21
III.6.2.	Présentation du vaccin Clavax®.....	22
	Étude expérimentale	
I.	Objectifs.....	23
II.	Matériel.....	23
II.1.	Matériel non biologique.....	23
II.2.	Matériel biologique.....	24
III.	Méthodes.....	25
III.1.	Décongélation d'une ampoule de cellules BSR et mise en culture.....	26
III.2.	Passage d'entretien.....	26
III.3.	Surveillances des cultures après l'entretien.....	27
III.4.	Passage d'infection.....	28
III.5.	Récolte des suspensions virales.....	29
III.6.	Titration virale.....	29
III.6.1.	Technique du titrage de la suspension virale.....	29
III.6.2.	Lecture finale du titrage.....	30
	Résultats.....	31
	Discussion.....	35
	Conclusion.....	36

Glossaire

Glossaire

Effet cytopathique (E.C.P) : altérations métaboliques, biochimiques et morphologiques d'une cellule hôte infectée par un virus.

Passage de trypsination des cellules : repiquage des cellules par dissociation enzymatique afin de les maintenir en culture.

Passage d'adaptation de virus : étape qui comprend l'infection des cellules par le virus puis récolte, clarification et titrage de la suspension virale obtenue.

Souche vaccinale vivante atténuée : Virus dont on a réduit la capacité de produire la pathogénicité chez l'individu, dont le but est de l'utiliser pour la vaccination, c'est-à-dire provoquer une réaction immunogène sans pouvoir pathogène.

Titrage *in vitro* d'une suspension virale : évaluation du pouvoir cytopathogène d'une suspension virale sur les cellules.

Introduction

Introduction

La clavelée ou variole ovine est une poxvirose spécifique du mouton, hautement contagieuse et meurtrière (Achour *et al.*, 2000). Elle est présente dans les élevages d'Afrique, d'Asie et du Moyen-Orient.

Au Maghreb, elle provoque, sous forme d'épizooties ou d'enzooties, des pertes économiques considérables en agneaux, en laine, en viande et en lait, et ce plus particulièrement dans les régions à vocation pastorale (Bhanuprakash *et al.*, 2006). En Algérie, cette maladie représente la dominante pathologique la plus importante de l'élevage ovin, estimé à plus de vingt-six millions de tête en 2013 (DSV, 2013).

Les souches de *Capripoxvirus* circulent entre les ovins et les caprins, mais la plupart entraînent des signes cliniques plus sévères chez l'une ou l'autre des espèces. D'autre part, ces souches peuvent se recombiner et présenter alors un spectre d'hôtes intermédiaire et plusieurs niveaux de virulence. La période d'incubation varie de 8 à 13 jours après que l'animal sensible ait été en contact avec un animal infecté. Elle peut être réduite à 4 jours si l'infection est expérimentale, par inoculation intradermique ou par des insectes (Bhanuprakash, 2006). L'homme n'est pas sensible aux infections à *Capripoxvirus* (OIE, 2008).

Dans les pays affectés, la lutte contre la clavelée repose essentiellement sur la prophylaxie médicale, la vaccination demeurant le seul moyen connu et efficace capable de conduire à l'éradication, ou tout au moins d'atténuer les conséquences néfastes de la maladie (Bhanuprakash, 2006).

En Algérie, auparavant, la prophylaxie de la clavelée faisait appel à l'utilisation d'un vaccin de type sensibilisé. Celui-ci a été produit sur mouton à l'aide d'une souche d'origine marocaine dénommée Casablanca (Achour *et al.*, 2000).

Chaque année, l'Institut Pasteur d'Algérie (I.P.A) produit en moyenne 20 millions de doses de ce vaccin, en fonction des besoins exprimés par la Direction des Services Vétérinaires (D.S.V), pour assurer les campagnes nationales de prophylaxie (I.P.A., 2013).

Le principal objectif du présent travail est d'étudier l'adaptation de la souche vaccinale RM65 sur un nouveau support cellulaire à savoir la lignée immortelle BSR, tout en effectuant des inoculations successives avec la souche virale RM65 sur cette lignée. L'étude de l'apparition d'Effet Cytopathique (E.C.P), la récolte et le titrage des suspensions virales obtenues sont nécessaires dans chaque passage pour établir la cinétique de rendement viral au cours des

passages successifs. L'étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de production et de développement des vaccins viraux vétérinaire de l'I.P.A.

Le présent manuscrit est composé de deux parties : une première partie, bibliographique, consacrée à une mise au point sur la clavelée et la prévention vaccinale de celle-ci, et une seconde partie expérimentale sur l'adaptation du poxvirus sur la lignée cellulaire BSR.

Partie

Bibliographique

I. Étude clinique de la clavelée

I.1. Définition

La clavelée est une maladie contagieuse, virulente, inoculable, spécifique au mouton, due à un virus appartenant à la famille des Poxvirus, découvert en 1903 par Borrel (Belkessam, 2013).

Elle se traduit par des éruptions papuleuses pouvant devenir pustuleuses, apparaissant sur la peau et intéressant secondairement les muqueuses, notamment les muqueuses respiratoires, digestives et génitales (Fassi-Fehri *et al.*, 1983), et peut se terminer par la mort (OIE, 2018).

Elle est inscrite sur la liste A de l'ancienne classification des maladies notifiables à l'OIE et figure parmi les maladies des ovins et des caprins dans la nouvelle classification (OIE, 2018).

Par sa fréquence, sa diffusion et sa gravité, elle constitue en Algérie l'une des principales maladies légalement contagieuses du cheptel ovin, à déclaration obligatoire selon l'article 2 du décret exécutif n° 96-66 du 22 février 1995 modifié et complété (Jora, 2006).

La clavelée ou variole ovine est également connue sous plusieurs appellations selon les langues : sheep pox en anglais, viruela ovine en espagnol, vaiolo ovino en italien, et jedri en arabe (FAO, 2000).

I.2. Symptomatologie

Les symptômes associés aux poxviroses sont globalement identiques quel que soit l'agent pathogène considéré. On peut ainsi distinguer, après une incubation de 4 à 21 jours (OIE, 2018), deux formes pathologiques : une forme classique, vésiculeuse ou nodulaire, et une forme compliquée (Perrin, 2007).

La forme classique vésiculeuse se décompose en 4 phases :

- La phase d'invasion pendant 2 à 4 jours
- La phase d'éruption pendant 3 à 4 jours
- La phase de sécrétion pendant 3 à 4 jours
- La phase de dessiccation pendant 4 à 5 jours (OIE, 2018).

Lors de la première phase, dont la durée est variable suivant le pathogène, les hôtes manifestent de l'hyperthermie (40 à 41,5°C), de l'abattement, une perte d'appétit et des sécrétions lacrymales, salivaires et nasales (Perrin, 2007). L'anorexie est rare, sauf si des lésions buccales empêchent l'animal de se nourrir. L'avortement est également rare (OIE, 2008).

Au cours de la phase d'éruption, des taches roses ou rouges apparaissent, s'étendent rapidement et se transforment en papules de diamètre variable. L'éruption peut se généraliser à tout le corps. Au cours de cette phase, la température de l'hôte redevient normale (Perrin, 2007).

La phase de sécrétion, ou papulo-vésiculaire, se caractérise par l'affaissement des papules et leur infiltration par un liquide jaune-rougeâtre qui les transforme en vésicules. La laine, à ce moment, s'arrache facilement. La formation de ces vésicules n'est pas toujours observée et on note, à sa place, l'exsudation d'un sérum qui coagule à la surface des papules (Fassi-Fehri et Lefèvre, 2003).

Finalement, la dernière phase de la maladie se traduit par une dessiccation des papules et la formation de croûtes. Ces dernières se détachent et font place à des processus cicatriciels laissant des traces indélébiles (Perrin, 2007).

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

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

Des complications bactériennes peuvent survenir, notamment par *Pasteurella* (Fassi-Fehri et Lefèvre, 2003).

Par ailleurs, bien que rarement signalées, des formes suraigües ou septicémiques existent, qui se caractérisent :

- Chez les jeunes agneaux par une mortalité élevée avant l'apparition des lésions cutanées. Seuls les symptômes généraux, hyperthermie et abattement, sont visibles ;
- Chez les adultes par une exacerbation des symptômes généraux et une éruption généralisée de papules hémorragiques, d'où son nom de clavelée noire, et d'œdèmes largement répandus. D'évolution plus courte que la forme aiguë, elle se termine le plus souvent par la mort (Lefèvre, 1983).

I.3. Lésions

Sur la peau, il y a habituellement des macules, des papules et/ou des lésions nécrotiques et des croûtes, entourées de zones d'œdème, d'hémorragie et de congestion. Les papules pénètrent dans le derme et l'épiderme ; dans les cas graves, elles peuvent s'étendre jusqu'à la musculature (fig. 1 à 4). Les lésions cutanées pourraient ne pas être aussi apparentes à l'autopsie que chez les animaux vivants. Les muqueuses des yeux, du nez, de la bouche, de la vulve et du prépuce peuvent être nécrotiques ou ulcérées. Les poumons contiennent souvent des zones congestionnées, œdémateuses ou consolidées, et des nodules fermes blancs ou gris. Les nodules

sont particulièrement fréquents dans les lobes diaphragmatiques. Aux premiers stades de la maladie, ils peuvent apparaître sous forme de taches rouges. Les papules, ulcérées ou non, sont courantes sur la muqueuse abomasale. Les nodules, papules et autres lésions peuvent également se trouver dans d'autres parties du tube digestif et de l'appareil respiratoire, y compris le rumen, le gros intestin, le pharynx, la trachée et l'œsophage (tableau 1). Des foyers sous-capsulaires discrets et pâles sont parfois présents à la surface des reins, du foie et des testicules. Les ganglions lymphatiques dans tout le corps sont habituellement hypertrophiés et œdémateux, et ils peuvent être congestionnés et hémorragiques (CFSPH, 2017).

Tableau 1 : Fréquence des lésions de clavelée selon les organes atteints (Murty et Singh, 1971)

Organes	Pourcentage (%)
Peau	100%
Poumons	90,8%
Larynx-pharynx	90,8%
Trachée	79%
Langue	71%
Caillette	31,5%
Reins	26%
Rumen	25%
Réseau	17%
Œsophage	9%
Foie	6,6%
Feuillet	1%
Utérus	1%



Figure 1 : Macules coalescentes avec pétéchies sur la peau inguinale (CFSPH, 2017)

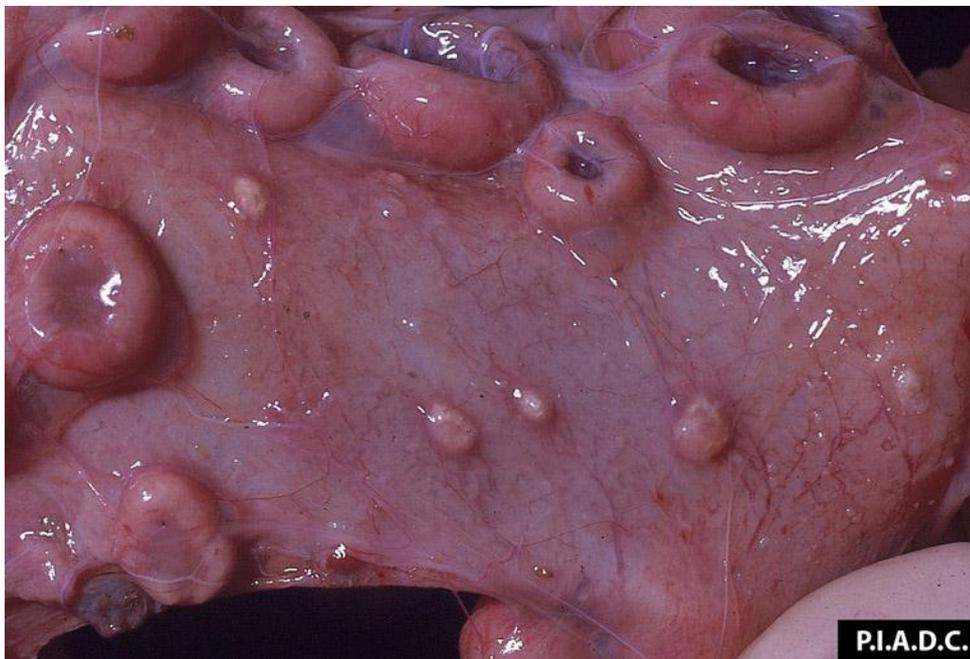


Figure 2 : Endomètre contenant plusieurs papules orangées au milieu des caroncules (CFSPH, 2017)



Figure 3 : Zones et foyers hémorragiques et nécrotiques sous la peau (CFSPH, 2017)



Figure 4 : Scrotum et peau inguinale : papules brun rouge et ulcères hémorragiques sur l'aspect médial du grasset (CFSPH, 2017)

I.4. Diagnostic

I.4.1. Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique repose sur l'observation d'hyperthermie associée à des éruptions cutanées papuleuses, pustuleuses ou nodulaires (Inoshima *et al.*, 2000).

Les lésions de la variole ovine sont visibles dans la zone glabre : périnée, vulve, scrotum, sous la queue, autour des lèvres et des paupières.

Du point de vue anatomopathologique, les lésions congestivo-hémorragiques, les pustules et les papules, à localisation cutanée, trachéale ou pulmonaire, sont très significatives (Fassi-Fehri et Lefèvre, 2003).

I.4.2. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel doit être conduit avec les maladies suivantes :

- ✓ Ecthyma contagieux,
- ✓ Peste des petits ruminants,
- ✓ Autres dermatoses telles que la gale ou la dermatophilose (Anonyme, 2018).

On note :

- Fièvre aphteuse : l'apparition des aphtes au niveau du pied et les boiteries consécutives lèvent tous les doutes.
- Gale sarcoptique : touche uniquement la tête, avec croûtes, sans formation de papules ou vésicules.
- Dermite pustuleuse mammaire : atteint les mamelles et la face interne des cuisses des brebis.
- Accidents de photosensibilisation (Lefèvre, 1983).
- Eczéma du mouton : se différencie par l'absence de pustules et l'absence de fièvre.
- Ecthyma contagieux : localisation des lésions vésiculeuses exsudatives croûteuses au niveau des lèvres et de la gencive ; absence de généralisation.
- Peste des ruminants : se distingue par des érosions ulcératives des muqueuses linguales et buccales, ainsi que par les lésions de l'appareil respiratoire.
- Acné : inflammation localisée des glandes sébacées. Ce sont des pustules cutanées indolores, diversement localisées, apparaissant après la tonte, sans atteinte de l'état général (Belkessam, 1977).
- Dermatophilose : les nodules se sentent à la palpation plus qu'ils ne se laissent voir (Angba et Pierre, 1979).

I.4.3. Diagnostic expérimental

Des analyses sérologiques (recherche d'anticorps) ou virologiques (recherche de virus), réalisées à partir de prélèvements sanguins ou de biopsies cutanées, permettent de confirmer les suspicions cliniques (Anonyme, 2018) :

- Virologie : mise en évidence du virus en microscopie électronique, isolement en culture cellulaire à partir des lésions cutanées ou des lésions pulmonaires. Détection possible de l'antigène viral par ELISA (DSCR, 2018)

- Sérologie : séroneutralisation, immunofluorescence indirecte, immunodiffusion en gélose et ELISA (DSCR, 2018).

L'autopsie peut également corroborer la suspicion clinique si elle révèle des nodules sur différents organes tels que les poumons, le larynx, la trachée, la langue, la caillette et le rumen (Anonyme, 2018).

I.5. Prophylaxie

I.5.1. Prophylaxie sanitaire

- **Dans les zones indemnes**, la prophylaxie sanitaire consiste à éviter l'introduction d'animaux et de produit animaux, la laine et les peaux notamment, provenant d'une zone suspecte ou infectée. Tout échange implique la mise en quarantaine des animaux avant leur introduction dans le troupeau et la désinfection de la laine et des peaux par des produits actifs (Bhanuprakash *et al.*, 2006).

- **Dans les zones infectées**, il faut immédiatement identifier et isoler les malades. La séquestration des troupeaux se prolongera au moins durant 45 jours après guérison clinique (ou mieux abattage des troupeaux contaminés). La destruction des cadavres, la désinfection et la protection à l'importation (quarantaine) sont des mesures souvent insuffisantes en zone d'enzootie (FAO, 2000).

I.5.2. Prophylaxie médicale

La prophylaxie médicale est la base de la lutte en zone d'enzootie. Elle est fondée essentiellement sur l'emploi de vaccins à virus modifié par passage en série en culture cellulaire (exemple de la souche RM/65, obtenue en Iran par 30 passages sur cellules rénales de mouton) ou spontanément atténué. L'immunité est précoce (8 jours) et prolongée (2 ans).

Les autres possibilités sont peu ou plus du tout utilisées (vaccins inactivés) ou interdites (clavelisation) (DSCR, 2018).

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

I.6. Législation sanitaire

La clavelée est classée comme un danger sanitaire de 1ère catégorie soumis à l'élaboration d'un plan national d'intervention sanitaire d'urgence ; il est inscrit sur la liste des maladies réputées contagieuses (OIE, 2013).

Les recommandations relatives aux échanges de marchandises et aux importations d'animaux, pour la clavelée, sont édictées dans le code sanitaire pour les animaux terrestres en son annexe 01 (OIE, 2018).

Deux situations sanitaires peuvent être prises en considération :

I.6.1. Pays indemne de clavelée et de variole caprine

Un pays peut être considéré comme indemne de clavelée lorsqu'il est établi que cette maladie n'y existe pas depuis au moins trois ans. Ce délai est ramené à six mois après l'abattage du dernier animal atteint de la maladie pour les pays pratiquant l'abattage sanitaire, associé ou non à la vaccination contre la clavelée et la variole caprine (Article 14.9.3 du code sanitaire pour les animaux terrestres) (OIE, 2018).

I.6.2. Zone infectée par la clavelée

Une zone sera considérée comme infectée par la clavelée et la variole caprine jusqu'à ce qu'il se soit écoulé :

- 21 jours au moins après la confirmation du dernier cas et l'achèvement des opérations d'abattage sanitaire et de désinfection.
- Six mois après la guérison clinique ou la mort du dernier animal atteint de la maladie si l'abattage sanitaire n'y a pas été pratiqué.

(Article 14.9.4 du code sanitaire pour les animaux terrestres) (OIE, 2018).(Annexe 01).

II. Étude épidémiologique de la clavelée

II.1. Historique

La clavelée est décrite et connue depuis l'antiquité. Plusieurs épizooties ont été rapportées en Europe entre le 13^{ème} et le 19^{ème} siècle. La première description détaillée de la maladie a été faite par Joubert en 1578. En 1763, Bourgelat en reconnaît le caractère infectieux, puis Borrel (1902) en démontre la nature virale et décrit les inclusions cytoplasmique oxyphiles désignées sous le nom de corpuscules de Borrel (Fassi-Fehri, 1988).

En 1935, Bridé cultive pour la première fois le virus *in vitro* sur des fragments de testicules de moutons, mais ce n'est qu'à partir des années 1950 que d'autres travaux ont suivi, tant sur des cultures cellulaires de tissu cutané, pulmonaire, testiculaire ou rénal, provenant de fœtus ou de jeunes animaux de l'espèce ovine, caprine ou bovine, que sur celles de cellules provenant de la membrane chorio-allantoïdienne d'embryon (Salah et Yassa, 1999).

II.2. Importance

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

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

Par ailleurs, en plus des pertes directes (mortalité, avortement), les varioles ovine et caprine, comme toutes les maladies infectieuses, ont un impact considérable sur les productions : lait, viande, peaux, laine. En outre, la commercialisation et l'exportation des animaux sont entravées par la mise obligatoire en quarantaine (Lefèvre, 1983).

II.3. Espèces affectées

Jusqu'au 18^{ème} siècle, aucun auteur n'a mentionné la contagion possible de la clavelée à d'autres espèces que les ovins. Au début du 19^{ème} siècle, d'autres espèces animales sont considérées comme sensibles à la clavelée par Huzard, Odoardi, Sacco... : bovins, chiens, chèvres, singes, etc. Mais, en 1838, Hurtrel d'Arboval écarte toutes ces considérations en rappelant : "on a essayé d'inoculer la clavelée à différentes volailles, à des bœufs, des chevaux, des lapins, des chiens et

même des singes ; mais la clavelisation n'a produit aucun effet ni sur les uns ni sur les autres de ces animaux" (Blanco, 1999)

Habituellement, seul le mouton est sensible à cette maladie. Des souches "sheep and goat pox viruses", dans certaines zones géographiques (Kenya par exemple) affectent aussi bien le mouton que la chèvre. La variole caprine est le plus souvent, par ailleurs, due à un virus spécifique. Des cas spontanés ont été décrits chez la gazelle.

La clavelée n'est pas transmissible à l'homme (Anonyme, 2018).

II.4. Répartition géographique de la maladie

C'est une maladie à déclaration obligatoire, recensée sur la liste de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE, 2018). En France, elle est classée en danger sanitaire de première catégorie. La Grèce est le seul pays de l'Union Européenne où cette maladie est identifiée : au 22 janvier 2018, la plateforme d'épidémiosurveillance en santé animale ESA publiait une note sur l'évolution de cette maladie en Grèce.

La clavelée ovine est en revanche endémique dans d'autres régions du monde : nord de l'Afrique (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye...), Proche et Moyen-Orient, Asie (Népal, Inde, Chine, Russie) (OIE, 2018) et en Turquie et dans certaines parties d'Asie, y compris le sous-continent indien. On pense que les éclosions fréquentes en Grèce et occasionnelles en Bulgarie sont causées par des virus qui entrent dans ces pays pendant les éclosions qui se produisent en Turquie (CFSPH, 2017).

II.5. Agent pathogène

II.5.1. Morphologie et structure du virus

Le virus de la clavelée appartient à la famille des *Poxviridae*, sous-famille *Chordopoxvirinae*, genre *Capripoxvirus* (OSAV, 2013).

Le virus de la variole ovine est de grande taille :

Cohen <i>et al.</i>	Chaboussi
310 × 240 nm	320 × 280 nm

Au microscope électronique, les virions ont un aspect rectangulaire, aux angles arrondis ou ovalaires. Ils sont entourés d'une membrane de type unitaire mais certaines particules semblent posséder deux membranes. Un "core" central biconcave, en forme d'haltère, a une structure fibrillaire et est flanqué de deux corps latéraux lenticulaire (Lefèvre, 1983).

Le génome des *Poxviridae*, est composé d'un ADN double brin linéaire, d'une taille comprise entre 130 et 375 kpb (Moss, 1992). La partie essentielle du génome est située en région centrale, fortement conservée au sein du genre et est composée de gènes intervenant dans la réplication du virus ainsi que dans la synthèse des protéines de structure. Les régions situées aux extrémités sont composées de gènes non essentiels à la réplication mais pouvant être impliqués notamment dans la virulence. Le génome est associé à une ADN-polymérase virale. Le séquençage du virus de la variole ou de la vaccine permet de dénombrer environ 200 gènes (Goebel *et al.*, 1990).

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

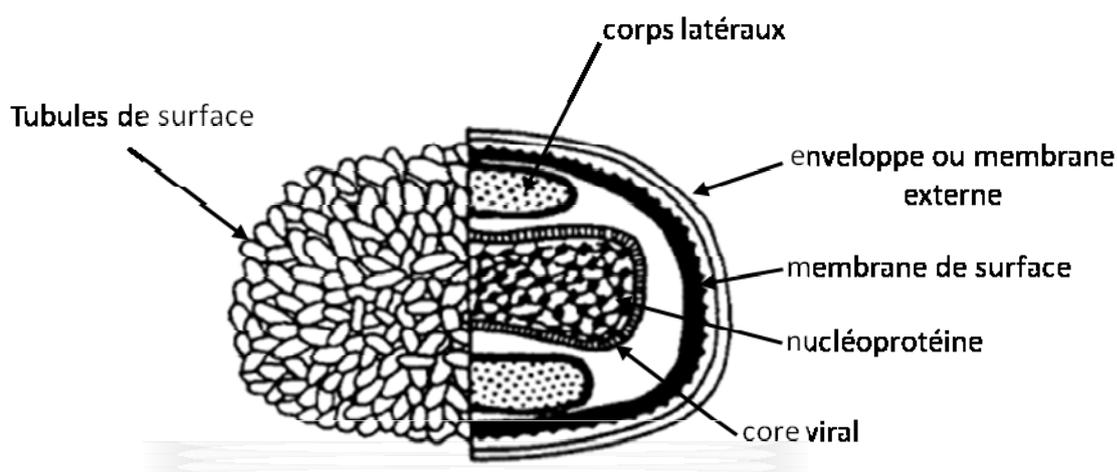


Figure 7. Représentation schématique des poxvirus (Van Regenmortel *et al.*, 2000)

II.5.2. Propriétés physico-chimiques

Le virus claveleux est sensible à plusieurs agents physiques et chimiques :

- La chaleur le détruit rapidement à 60-62°C ; par contre, le froid le conserve pendant plusieurs mois (Belkessam, 1977)
- Les antiseptiques et les solutions alcalines le détruisent très rapidement (Belkessam, 1977)
- L'éther 20%, le chloroforme, le phénol 2% et le formol 1% l'inactivent en 15 min. Il est aussi sensible à des détergents tels que dodécylsulfate de sodium (FAO, 2000).

Toutefois, il est très résistant à la dessiccation d'où son infectiosité qui persiste plusieurs mois dans les croutes varioliques. Il peut également résister dans la laine pendant 2 mois et dans les locaux pendant 6 mois (FAO, 2000).

II.5.3. Propriétés biologiques

II.5.3.1. Culture *in vivo*

Cette culture n'est possible que sur mouton.

On peut provoquer la maladie par diverses voies. Cependant, deux procédés ont un intérêt pratique :

- La voie intradermique offre la possibilité d'obtenir des lésions situées au siège de l'inoculation. Elle permet donc le titrage d'une suspension de virus claveleux injecté par voie intradermique sur les flancs de l'animal

- La voie sous cutanée : l'injection de 2-5 ml de lymphé claveleuse dilués dans 600 ml d'eau physiologique provoque l'apparition d'un œdème inflammatoire aigu intéressant le derme, l'hypoderme et les muscles superficiels. On peut y récolter une quantité importante de virus (Belkessam, 1977).

Le rendement en virus varie avec les souches, le nombre de passage et les races de mouton (Fassi-Fehri et Lefèvre, 2003).

II.5.3.2. Culture *in ovo*

Le virus claveleux peut se cultiver sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œufs embryonnés.

En 1957, Sabban avait montré que la multiplication du virus sur cette membrane exige des passages alternés sur mouton et embryon de poulet (Belkessam, 1977).

II.5.3.3. Culture *in vitro*

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

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

II.5.4. Pouvoir immunogène

Les propriétés antigéniques des *Capripoxvirus* se révèlent par l'apparition, dans l'organisme des animaux infectés, d'anticorps neutralisants, fixant le complément, et précipitants (Lefèvre, 1983).

Les virus des varioles ovines et caprines présentent une remarquable stabilité antigénique et on ne leurs reconnaît qu'un seul type antigénique (Lefèvre, 2003).

II.6. Épidémiologie

II.6.1. Analytique

- Sources virales : ovins malades ou porteurs chroniques (contagiosité possible durant 1 à 2 mois)(Belkessam, 1977). . C'est à l'occasion de rassemblements que les animaux sensibles sont les plus exposés, dans les bergeries ou les pâturages, sur les marchés et aux points d'eau (Bhanurakasho *et al.*, 2006).

- Matières virulentes : représentées par les sécrétions nasales, matières fécales, et principalement les produits d'exsudation des lésions cutanées et les croûtes desséchées, riches en virus et à l'origine d'aérosols infectieux(Belkessam, 1977).

- Virus résistant : il peut survivre des années dans les croûtes desséchées (Belkessam, 1977). Il est inactivé en quelques minutes par le phénol à 2%, le formol à 1% et l'eau de Javel à 1 degré chlorométrique (Lefèvre, 2003).

- Transmission directe ou indirecte (fourrage et litière souillés) : Contamination habituelle par voie respiratoire (poussières virulentes), éventuellement par voie cutanée ou muqueuse (plaies) (Belkessam, 1977). La transmission indirecte à distance se fait à partir de croûtes desséchées riches en virus, qui peuvent persister dans la laine et les peaux 2 à 3 mois (Fassi-Fehri et Lefèvre, 2003). La transmission mécanique se fait par des vecteurs qui peuvent être des insectes tels que les stomoxes (*Stomoxys calcitrans*) se nourrissant de lésions cutanées des animaux malades et transmettant le virus par piqûres aux animaux sains, ou par du matériel souillé (instruments, véhicules de transport) (Haller *et al.*, 2013).

La réceptivité dépend de plusieurs facteurs :

- Sexe : les femelles seraient plus atteintes que les mâles (Murty et Singh, 1971).

- Âge : formes graves chez les agneaux (Belkessam, 1977).

- Race : les races à laine (mérinos) seraient plus sensibles que les races à poils (Fassi-Fehri et Lefèvre, 2003).

- Conditions d'élevage : lorsque les moutons sont en bon état d'entretien, l'affection reste souvent discrète ou bénigne et ne présente aucune gravité. Mais, lorsque les animaux sont affaiblis par des maladies parasitaires, par la disette et le froid, la maladie s'éveille et prend des allures épizootiques (Belkessam, 1977).

II.6.2. Synthétique

La maladie sévit à l'état enzootique dans de nombreuses régions, avec extension progressive dans les troupeaux, souvent par vagues successives toutes les 3 à 4 semaines (contagiosité maximale en phase de dessiccation).

II.7. Impact économique de la clavelée

La clavelée exerce un impact négatif sur les échanges commerciaux d'ovins (Diallo et Viljoen, 2007).

La clavelée est sans doute la plus répandue et la plus contagieuse des maladies virales des ovins dans les pays méditerranéens.

Elle sévit à l'état enzootique en Afrique du Nord et au Proche-Orient, avec des poussées épizootiques qui provoquent des pertes considérables du fait de la mortalité élevée des agneaux, des avortements, des mammites et des dommages que subissent les peaux et la laine (Blajan, 1984).

La morbidité et la mortalité varient et peuvent être influencées par la race de l'animal, son âge, son immunité contre les *Capripoxvirus* et la souche de virus.

Des maladies bénignes sont courantes chez les races indigènes dans les zones endémiques, mais des maladies plus graves peuvent être observées chez les animaux jeunes ou stressés, chez des sujets atteints d'infections concomitantes ou chez les animaux provenant de régions où il n'y a pas eu de poxvirose depuis un certain temps. Les taux de morbidité déclarés chez les races indigènes varient considérablement, allant de 1 à 90%. Bien que le taux de mortalité global soit souvent inférieur à 10%, il dépasse parfois 50%, et des taux de létalité de près de 100% ont été signalés chez certains jeunes animaux très réceptifs.

La maladie touchant les races ovine et caprine importées est généralement grave lorsque ces animaux sont amenés dans une zone endémique. Les taux de morbidité et de mortalité peuvent avoisiner les 100% dans certains troupeaux nouvellement importés (CFSPH, 2017).

II.8. Différentes souches du virus claveleux dans le monde

De nombreuses souches du virus claveleux ont été recensées par la littérature. Ces souches ont été nommées d'après le lieu isolement. Certaines d'entre elles ont été utilisées comme souches vaccinales après leur atténuation sur différentes cultures cellulaires, à différents passages (Bhanuprakash, 2006 ; Zhou, 2012) (Tableau 2 et 3).

Tableau 2 : Souches des virus claveux isolées en Algérie (Lamien, 2011)

Nom de la souche	Origine	Espèce d'origine	Source
SPPV Algérie/93 Djelfa	Algérie	Ovine	INMV-LCV/Algérie
SPPV Algérie/05 Illizi	Algérie	Ovine	INMV-LCV/Algérie
SPPV Médéa	Algérie	Ovine	INMV-LCV/Algérie
SPPV El Bayadh 1	Algérie	Ovine	INMV-LCV/Algérie
SPPV E Bayadh 2	Algérie	Ovine	INMV-LCV/Algérie

Tableau 3 : Différentes souches de virus claveux isolées dans le monde (Bhanuprakash, 2006)

Nom de la souche	Lieu / pays d'isolement
Romania, Roumanian-Fanar	Roumanie
Cairo	Égypte
Persian	Iran
Mongolian	Mongolie
Russian	Russie
Turkey	Turquie
Chinese	Chine
Raniped, Jaipur, Hydrabed, Mysore, Karnal, Mathura, Indochina	Inde
K Strain	Kenya
Perego M	Algérie
RM / 65	Yougoslavie
Kazakhstan	Kazakhstan
Starvopol, Nairobi, Kenya	Kenya
SP8, Pakistan, A1 Strain, Oendic, Kedong, Soba, Bucarest, Bakirkoy	Pakistan
Pendic, SPV/ RH, Mauritanian, Chitinsk	Mauritanie
Algerian	Algérie

III. Vaccins et vaccination anti-claveuse

III.1. Définition et principe de la vaccination

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

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

Les poxvirus sont à l'origine de la découverte de la vaccination par Jenner en 1796, qui a réussi à protéger l'homme contre la variole en lui inoculant par scarification le virus de la vaccine, variole des bovins ou cowpox (Tortora *et al.*, 2003).

III.2. Histoire

Dans la seconde moitié du 19^{ème} siècle, Pasteur explore le rôle des microbes dans la survenue des maladies contagieuses, en travaillant sur des animaux d'élevage. Il crée ainsi le premier vaccin atténué. En l'honneur de Jenner, il invente le terme "vaccin". En 1881, Pasteur énonce le principe de la vaccination : inoculer "des virus affaiblis ayant le caractère de ne jamais tuer, de donner une maladie bénigne qui préserve de la maladie mortelle". Après avoir mis au point un autre vaccin animal atténué contre la maladie du charbon qui décimait les troupeaux ovins et bovins, Pasteur oriente ses recherches vers la vaccination humaine. Il se penche sur une maladie touchant à la fois l'animal et l'homme : la rage.

À partir de cerveaux d'animaux morts de la rage, Pasteur parvient à isoler, purifier et inactiver la souche de l'agent contagieux. En 1885, il met au point le premier vaccin humain à virus atténué (Vaccination-info.BE, 2019).

III.3. Objectifs de la vaccination

Le principe de la vaccination consiste à administrer à un être vivant un principe actif capable d'induire une immunité spécifique vis-à-vis d'un agent pathogène, ainsi qu'une mémoire immunitaire susceptible d'amplifier plus rapidement la réponse immune après primo-infection.

La vaccination est la méthode de lutte la plus efficace contre des maladies infectieuses aiguës, elle permet une baisse de l'incidence et de la prévalence de l'infection. Au contraire, la vaccination est habituellement moins efficace contre les agents pathogènes qui développent des infections persistantes chez l'hôte (Herpesvirus, lentivirus, pestivirus, brucelles...).

La vaccination permet d'obtenir une défense contre les symptômes de la maladie (baisse de la prévalence des cas cliniques) alors que l'efficacité sur la circulation de l'agent pathogène (incidence de l'infection) est habituellement plus limitée.

Un vaccin idéal doit :

- Induire une réponse anticorps,
- Induire une mémoire immunitaire,
- Ne pas être dangereux (innocuité),
- Être stable à la conservation (Camille, 2009).

III.4. Types de vaccins

III.4.1. Vaccins vivants atténués

Ce sont les meilleurs immunogènes. Ils sont généralement obtenus par passages successifs de l'agent infectieux sur des cultures cellulaires visant à atténuer sa virulence.

Ces vaccins ont l'avantage d'induire une immunité mimant l'infection par la souche microbienne sauvage, mettant en jeu la réponse innée et une réponse adaptative humorale et cellulaire.

Le vaccin, étant vivant, est capable de diffuser dans l'organisme et d'induire des réponses dans différents sites anatomiques. Les problèmes majeurs de ces vaccins sont le risque de retour à la virulence (vaccin anti-poliomyélite avec une réversion de type neuro-virulence dans 1/500.000 cas de vaccinations) et de transmission d'un individu à l'autre quand le receveur est immunodéprimé (Paul *et al.*, 2015).

III.4.2. Vaccins inactivés

Contiennent des agents infectieux (ou une toxine produite par ceux-ci) qui ont été tués grâce à un produit chimique ou par la chaleur. Ils sont donc totalement inoffensifs, mais restent capables de susciter une réponse du système immunitaire.

Le vaccin injectable contre la poliomyélite, les vaccins contre la diphtérie, le tétanos, la coqueluche, l'*Haemophilus influenza* de type B, l'hépatite A, l'hépatite B, le pneumocoque, la grippe, l'encéphalite à tiques d'Europe centrale, l'encéphalite japonaise et la méningite à méningocoques A, C, W et Y sont des vaccins inactivés (Figaro, 2018).

III.4.3. Vaccins synthétiques

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

L'avantage est que si on sélectionne, par exemple, un morceau de membrane présent chez plusieurs antigènes, l'organisme sera protégé contre tous ces antigènes de façon efficace. Mais les antigènes sont sujets à mutations et ce vaccin nécessite, comme les autres, de nombreux rappels (Ifah Europe, 2008).

III.5. Culture cellulaire

La culture cellulaire est un processus complexe par lequel les cellules, procaryotes ou eucaryotes, sont cultivées dans des conditions contrôlées, en général à l'extérieur de leur environnement naturel. Dans la pratique, l'expression culture cellulaire se réfère à la mise en culture de cellules dérivées d'eucaryotes multicellulaires, notamment les cellules animales. Cependant, il y a aussi des cultures de plantes, de champignons, d'insectes et de microbes, y compris de virus, de bactéries et de protistes (Aquaportail, 2019).

On appelle culture cellulaire le maintien en dehors de l'organisme, des cellules non organisées en tissu mais capables de se diviser *in vitro* et d'exprimer des métabolismes et des fonctions spécifiques (Overblog, 2018)

La culture cellulaire n'apparaît qu'à partir de 1952 lors de l'introduction de la trypsination de tissus par Moscona. Il procède à la digestion de tissus d'œufs de poulet avec de la trypsine afin d'obtenir des cellules isolées ou des amas de cellules capables de se diviser *in vitro* (Magniez, 2008).

III.5.1. Différents types de lignées cellulaires

III.5.1.1. Culture primaire

Est la mise en culture de cellules d'organe ou de prélèvement. Les cellules récupérées par des techniques de dissociation cellulaire sont placées dans des milieux afin de proliférer (Slideplayer, 2019).

On utilise couramment des tissus d'animaux normaux (comme la peau, les reins, le foie) ou des embryons entiers pour établir des cultures cellulaires primaires (Lodish, 2005).

Les fibroblastes des tissus conjonctifs se divisent plus rapidement en culture que les autres cellules d'un tissu, et finissent par devenir le type cellulaire prédominant d'une culture primaire (Lodish, 2005).

Exemple de cellules primaires : cellules de rein de mouton (RM).

Les reins récoltés à partir des fœtus récupérés aux abattoirs sont débarrassés de leurs enveloppes, grattés de leur cortex et éliminés de leur médulla. Le cortex est ensuite découpé en petits fragments, lavé plusieurs fois à l'aide d'une solution tampon et soumis à une digestion enzymatique. La suspension cellulaire récoltée est centrifugée et le culot cellulaire repris dans une quantité adéquate de milieu de croissance additionné de sérum de veau fœtal, réparti en flacons de plastique qui sont incubés à 37°C. Par ce procédé, un tapis cellulaire complet est obtenu au bout de 4 à 5 jours d'incubation (Figure 6). Selon le cas, ces cellules sont soit ensemencées directement avec le virus, soit soumis à une trypsination afin de préparer des subcultures (Fassi-Fehri, 1983 ; Mirakabadi, 2013).

On peut aussi utiliser des cellules des 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} subcultures dans le but d'évaluer une éventuelle modification de l'effet cytopathogène (ECP) ou du titre viral (Fassi-Fehri, 1983 ; Mirakabadi, 2013).

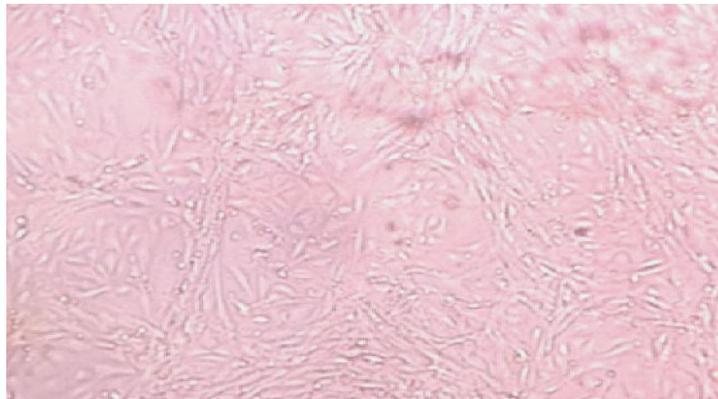


Figure 6 : Cellules RM cultivées en flacon de culture cellulaire (x 50) (Fessi Fehri, 1983)

III.5.1.2. Cellules de lignée immortelles

Il s'agit de cellules sélectionnées pour leurs caractéristiques, leur capacité à recevoir le virus inoculé et leur aptitude à se multiplier dans des conditions de culture classique (Duigou, 2005 ; Barrett, 2009).

Quelle que soit leur origine, les cellules de lignées immortelles possèdent souvent des chromosomes avec des structures anormales. De plus, le nombre de chromosomes dans ces cellules est généralement supérieur à celui de la culture normale dont ils sont issus et le nombre de leurs chromosomes augmente et diminue au fur et à mesure de la division des cellules en culture. Les cellules possédant un nombre anormal de chromosomes sont dites aneuploïdes (Lodish, 2005 ; Barrett, 2009).

La plupart des lignées cellulaires ont perdu une ou plusieurs des fonctions caractéristiques des cellules différenciées dont elles proviennent (Lodish, 2005).

Exemple de cellules de lignée immortelle : cellules BSR

Origine de la lignée BSR : les BSR ou BHK-21 sont des cellules rénales d'embryons de hamster (baby hamster kidney cells) : c'est une lignée de cellules fibroblastes extraites à partir de la région corticale des reins d'embryon de hamster de l'espèce *Mesocricetus auratus* (Anonyme, 2010).

Étude morphologique des cellules BSR :

L'observation des cellules BSR sous microscope, après le repiquage permet de voir des cellules en suspension. Les fibroblastes en suspension perdent leur forme allongée et deviennent plus au moins irrégulières, voire arrondies (Anonyme, 2010).

Après 1 heure, les cellules commencent leur fixation au fond de la boîte. Après 5 heures de culture, les cellules commencent leur division en formant des amas cellulaires fixés au fond de la boîte. Leur morphologie typique fibreuse et fusiforme s'installe de nouveau avec un noyau central ovale. Au cours de 24 à 48 heures, le tapis cellulaire devient semi-confluent, avec des vides par endroits dans le tapis cellulaire. Les cellules vont ensuite poursuivre leur prolifération jusqu'à atteindre 80-90% de confluence, pour être de nouveau repiquées. Le tapis devient confluent après le 3^{ème} - 4^{ème} jour. À 6 jours, les cellules commencent à former la deuxième couche, ce qui augmente le risque de mort cellulaire et la perte de tout le tapis. À 9 jours le tapis est altéré et décollé. Les cellules forment des amas en suspension.

La taille des cellules immortalisées (BSR) est volumineuse et dense au niveau du noyau et du cytoplasme (Figure 7), et leur prolifération est rapide. Elles sont bien réparties sur la surface de culture, avec une forme multipolaire ou bipolaire. Elles sont peu différentes des cellules primaires (Anonyme, 2010).

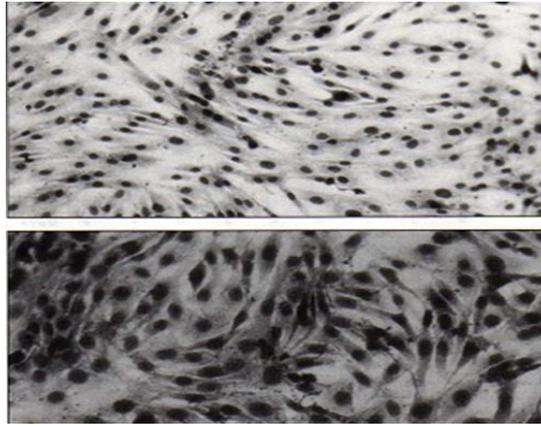


Figure 7. Morphologie des cellules de lignée primaire observées au microscope inversé :
En haut : Fibroblastes embryonnaires de chèvre (GEF, x 10), montrant une croissance avec un modèle typique de fibroblastes ; En bas : T-immortel fibroblastes de chèvre (TIGEF, Gr x 25) (Da Silva Teixeira *et al.*, 1997).

Les BSR sont des lignées cellulaires ayant été entretenues en continu pendant plus de 25 mois, et au moins 150 passages, sans aucun signe de sénescence, contrairement aux lignées primaires qui ont un nombre de passages limité (Anonyme, 2010)

L'analyse cytogénétique des cellules BSR en métaphases au 67^{ème} passage a révélé une anomalie du nombre des chromosomes (Anonyme, 2010)

Les BSR peuvent être transformées en cellules immortelles par passages, spontanément. Elles peuvent continuer à proliférer pendant plusieurs générations (Anonyme, 2010).

III.6. Vaccin anti-claveleux produit par l'Institut Pasteur d'Algérie

III.6.1. Historique

Le vaccin anti-claveleux est produit *in vivo* sur mouton, sous forme liquide à l'Institut Pasteur d'Algérie en 1913, par Alfred Boquit, médecin vétérinaire et biologiste français, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur d'Algérie ; 28 millions de doses ont été produites de 1913 à 1914 (Institut Pasteur France, 2013).

Après un arrêt de plusieurs années, la production a repris en 1965, sous forme liquide, en utilisant une souche vaccinale atténuée, importée de l'Institut Pasteur du Maroc ; 35.650 doses ont été produites, et 306.750 doses lyophilisées ont été importées du Maroc afin de couvrir les besoins nationaux. En 1967, le premier lot de vaccin lyophilisé produit *in vivo* a été fabriqué en Algérie (Institut Pasteur France, 2013).

En 1990, la production du vaccin *in vivo* lyophilisé est transférée à l'annexe d'El Hamma.

La mise au point du vaccin sur culture cellulaire a débuté en 2000 et le premier lot du vaccin anti-claveux sur culture cellulaire primaire lyophilisé a été produit la même année.

En mai 2011, le laboratoire de production du vaccin anti-claveux a été de nouveau transféré à l'annexe de Kouba (Institut Pasteur France, 2013).

III.6.2. Présentation du vaccin Clavax®

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

Il s'agit d'un vaccin atténué, lyophilisé, de la souche RM65, produite sur cultures de cellules rénales d'agneau fœtal, à l'institut Razi d'Iran par Ramyar et Hessami en 1968 (Archives de l'IPA, 2000/2003).

Cette souche vaccinale, utilisée pour la production du vaccin anti-claveux, est nommée ISRA car la souche RM65 a été fournie à l'Institut Pasteur d'Algérie en 1995 par l'unité de production des vaccins viraux vétérinaires de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) de Dakar (Institut Pasteur France, 2013). (Annexe 02).

Partie

Expérimentale

Étude expérimentale

I. Objectifs

La présente étude porte sur l'adaptation de la souche vaccinale RM65 du poxvirus sur la lignée cellulaire BSR.

Cette étude est réalisée dans le laboratoire de production et de développement des vaccins viraux vétérinaires de l'Institut Pasteur d'Algérie (Kouba) pendant une durée de 6 mois, du 24/02/2019 au 31/07/2019.

II. Matériel

II.1. Matériel non biologique

- **Consommable**

- Alcool chirurgical à 70%
- Boîtes de culture cellulaire stériles type flacon (25 cm², 75 cm², 150 cm²)
- Compresses stériles
- Eau distillée
- Gants, blouses, marqueur permanent
- Microplaques
- Pipettes graduées en verre classe A (5 ml, 10 ml)

- **Équipement de laboratoire**

- Agitateur magnétique et barreaux aimantés stériles
- Autoclave
- Aide-pipette
- Bain-marie
- Balance de précision
- Bec benzène
- Centrifugeuse réfrigérée
- Chronomètre
- Congélateur à -20°C
- Étuve à CO₂
- Hotte à flux laminaire verticale
- Micropipette
- Microscope inversé
- Pompe à vide

- Réfrigérateur
- Système de filtration (porte-filtre trépied, cuve en inox, Erlenmeyer munis d'un baromètre)
- Verreries diverses (Becher, Erlenmeyer, Flacons)

II.2. Matériel biologique

- **Fœtus d'ovins** : matrices de brebis récupérées de l'abattoir d'El Harrach juste après l'abattage
- **Souche vaccinale** : souche RM65, d'origine yougoslave, adaptée et atténuée à l'Institut Razi de Téhéran par 30 passages successifs sur cellules rénales d'agneau fœtal.

- **Cellules**

BSR : ces lignées cellulaires sont conservées sous forme congelée au sein du laboratoire de production et de développement des vaccins viraux vétérinaire, annexe de Kouba, Institut Pasteur d'Algérie.

Durant cette étude, les cellules BSR sont entretenues et maintenues en culture entre le 28^{ème} et le 35^{ème} passage.

Les cellules RM : les cellules primaires de rein du mouton ont été cultivées au sein du laboratoire de production et de développement des vaccins viraux vétérinaire. Récolter du fœtus ovins et réserver au titrage du vaccin anti claveleux.

- **Milieux et réactifs**

Différents milieux et réactifs sont utilisés pour la production et l'entretien des cellules ainsi que pour le titrage viral.

Tous les milieux sont stérilisés par deux filtrations successives sur filtres de 0,45 et 0,22 µm. Ces milieux font l'objet de contrôles de stérilité sur deux milieux (bouillon nutritif et Sabouraud liquide) avant leur utilisation. Tous les milieux et réactifs sont réchauffés à 37°C dans un bain marie avant leur emploi.

- **Milieu de culture DMEM (Dulbeco Modified Eagles Medium)**

Il s'agit d'un milieu synthétique constitué d'éléments de croissance des cellules (vitamines, glucose, acides aminés et électrolytes).

Il est commercialisé sous forme de poudre conditionnée en flacons ; il est dissout dans de l'eau distillée puis stérilisé par filtration (pH 7,4), après mise à l'étuve pendant 48 heures, puis conservés au réfrigérateur à +4°C.

Il faut calculer les volumes de SVF, d'antibiotiques et de glutamine pour obtenir les concentrations voulues (Annexe 03).

- **Sérum de veau fœtal (SVF)**

Le sérum de veau fœtal est utilisé comme complément de la culture cellulaire ; il contient les facteurs de croissance nécessaires à la prolifération des cellules.

Le SVF est décomplémenté au bain-marie à 56°C pendant une heure, et conservé au congélateur, à -20°C.

Le SVF est ajouté au milieu de culture à raison de 10% pour la mise en culture des cellules et leur entretien (trypsination), et de 5% pour l'infection par le virus.

- **Trypsine-Versene**

C'est une solution enzymatique utilisée pour la dispersion du tapis cellulaire et pour détacher les cellules de leur support (verre, plastique). Le versene renforce et accélère l'action de la trypsine (Annexe 04).

- **Solution antibiotique/antimycotique**

Les antibiotiques sont utilisés pour éviter la prolifération des micro-organismes dans les milieux et la contamination des cultures.

Après filtration, la solution est répartie dans des microtubes stériles à raison de 0,5 ml/microtube, qsp 500 ml de milieu (450 ml de milieu + 50 ml SVF).

Les inhibiteurs utilisés sont la Gentamycine, la Néomycine, et l'amphotéricine B (Annexe 05).

- **Rouge de phénol** : est utilisé comme indicateur de pH. Sa forme acide est jaune, sa forme basique est rouge. Sa zone de virage dans l'échelle de pH est située entre 6,6 et 8,4.

• **Milieux de cultures utilisés pour le contrôle de stérilité**

Ils sont préparés par le service des milieux de culture de l'IPA

- **Bouillon nutritif**, incubé 48 h à 37°C pour la recherche des germes aérobies.
- **Sabouraud liquide**, incubé 14 jours à température ambiante pour la recherche des champignons microscopiques.

La conservation des flacons se fait à -20°C.

III. Méthodes

L'adaptation du poxvirus sur la lignée cellulaire continue BSR est effectuée par des inoculations successives de la souche virale RM65 sur cette lignée, pour voir l'effet cytopathogène et bien savoir leur répartition et établir la cinétique de rendement viral, tout cela après la récolte des suspensions virales dans chaque passage et titrage.

III.1. Décongélation d'une ampoule de cellules BSR et mise en culture

Les cellules sont congelées dans des cryotubes à une concentration spécifique (Annexe 06). Elles sont récupérées de l'azote liquide puis mises dans un bain-marie à 37°C pour une décongélation complète, puis transférées dans un Flask.

Un volume de milieu de culture DMEM à 10% SVF est rajouté dans ce dernier pour obtenir le tapis cellulaire ; ensuite les cultures sont incubées pendant une nuit à 37°C, jusqu'à fixation des cellules aux supports. Dès que les cellules sont adhérentes aux supports, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais après 24 h de mise en culture.

III.2. Passage d'entretien

Les cellules cultivées *in vitro* adhèrent au support et adhèrent entre elles grâce à la matrice extracellulaire. Le repiquage des cellules nécessite leur décollement du support et leur séparation les unes des autres, ce qui est obtenu par action d'une enzyme protéolytique, la trypsine. Son action est inhibée par les ions calcium et par le sérum de veau fœtal (SVF). Donc avant de faire agir la trypsine, toute trace de SVF doit être éliminée ; c'est l'étape du lavage du tapis cellulaire.

Une fois que l'enzyme a individualisé les cellules, il faut que l'action de la trypsine soit arrêtée par addition de SVF avant que les cellules ne soient abîmées. Il faut donc contrôler l'action de la trypsine.

Le but principal de la trypsination est le détachement des cellules de leurs supports et la récupération des cellules pour les remettre en culture dans les deux autres boîtes

- **Protocole de trypsination et remise en culture des cellules**

Avant de faire la procédure il faut :

- Observer les cellules au microscope inversé pour distinguer l'aspect des cellules et noter la couleur du milieu, et bien sûr pour vérifier que le tapis cellulaire est uniforme et confluent.
- Préparer la quantité de milieu de culture et le nombre de boîtes pour le repiquage

Il faut répartir une boîte pour deux boîtes à 25 cm² de capacité égale ou bien une boîte dans une boîte de 75 cm².

À partir d'une seule boîte de culture qui a plus de 48-72 heures, le tapis confluent est détaché par la trypsination (figure 10). Il faut deux lavages successifs effectués par la trypsine afin d'éliminer le SVF.

Cette étape est répétée quand la concentration cellulaire récupérée après trypsination est élevée.

- **Mode opératoire de la trypsination**

Toutes ces opérations ont lieu sous hotte à flux laminaire :

- Vider la boîte à trypsiner de son milieu de culture.
- Ajouter de la trypsine-versene en quantité suffisante pour couvrir le tapis, puis rincer et jeter le surnageant au moins deux fois pour éliminer tout le milieu de culture mais en laissant un mince film de trypsine à la surface du tapis ; il faut laisser les boîtes de culture au moins 10 minutes dans l'étuve à 37°C, avec la surveillance du tapis toutes les deux minutes, à l'œil nu et au microscope inversé pour voir le décollement des cellules, car la trypsine agit rapidement.
- Après la récupération de la boîte à trypsiner de l'étuve, arrêt de la trypsine par l'introduction de 5 ml de milieu de culture DMEM à 10% SVF.
- Disperser soigneusement les cellules par aspiration et refoulement à la pipette ; à chaque refoulement, envoyer le liquide sur le fond de la flask pour bien finir le décollement des cellules.
- Diviser le volume de suspension cellulaire de 5 ml en deux (2,5 ml dans chaque nouvelle boîte) dès que le tapis est homogène (absence d'amas cellulaires au niveau du mur de la pipette).
- Compléter à qsp 10 ml de milieu de culture DMEM à 10% SVF (boîte de 25 cm² de surface contenant 10 ml de milieu).
- Numéroter les boîtes de chaque passage (numéro du passage et date).
- Placer les boîtes à l'étuve à 37°C et à 5% CO₂ (dévisser d'un quart de tour les bouchons des flasks à 75 cm²) pendant 24 heures.
- Observer sous le microscope inversé après 24 heures.
- Répéter l'opération jusqu'au 35^{ème} passage cellulaire.

III.3. Surveillances des cultures après l'entretien

- Variation du pH : le milieu de culture DMEM, qui est rouge à l'origine, devient jaune lorsque le milieu devient acide.

- Observation sous microscope photonique inversé la morphologie des cellules au cours de leurs prolifération.
- Contaminations : pour éviter la propagation de toutes les contaminations possibles au sein de l'enceinte de manipulation, on peut distinguer à l'œil nu car le milieu devient trouble.

- **Trois types de contaminations**

- Les contaminations bactériennes donnent un aspect trouble au milieu de culture et un décollement du tapis cellulaire, formant des amas cellulaires en suspension.
- Les contaminations toxiques apparaissent après épuisement des nutriments du milieu de culture et élaboration de toxines par les cellules. Cet aspect toxique pourrait avoir une origine externe, provenant des manipulations au laboratoire engendrant un décollement du tapis cellulaire et formation d'amas de cellules en suspension dans le milieu de culture.
- Les contaminations fongiques, qu'on distingue facilement suite à l'observation au microscope optique de filaments de mycoplasmes (figure 8C) et des champignons (figure 8B).

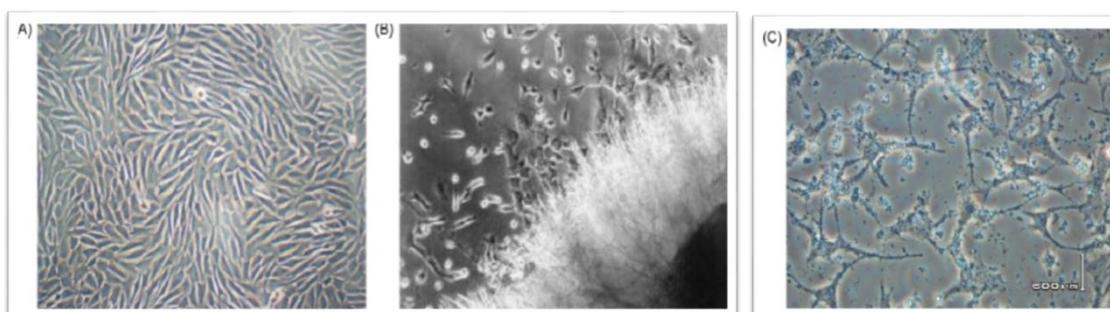


Figure 8 : Présence de contaminations (x40) (Li *et al.*, 2009)

A) fibroblastes sans contamination

B) fibroblastes contaminés par des champignons

C) fibroblastes contaminés par des mycoplasmes

III.4. Passage d'infection

La souche atténuée du virus claveleux utilisée est la souche vaccinale RM65 adaptée sur la lignée cellulaire BSR ; trois passages d'infection sont réalisés durant cette étude.

- **1^{er} passage d'adaptation (p31)**

Mode opératoire :

- Les boîtes présentant un tapis cellulaire confluent sont sélectionnées.

- Une quantité suffisante d'inoculum est préparé (1 ml est décongelé à +4°C dans un réfrigérateur pour une boîte de taille 25 cm²).
- Vider la boîte de son milieu.
- Inoculer les boîtes de culture avec la quantité correspondante d'inoculum
- Laisser à adsorber pendant une heure dans une étuve à 5% CO₂ à 37°C.
- Rajouter 10 ml de milieu DMEM à 5% de SVF à la boîte utilisée.
- Incuber dans l'étuve à 37°C pendant 5 à 7 jours.
- La boîte de culture témoin, cultivée dans le même milieu et dans les mêmes conditions sans inoculation virale, est également préparée.
- Une lecture quotidienne des boîtes sous microscope est réalisée afin de détecter l'effet cytopathogène (ECP).
- Cette opération est répétée jusqu'au dernier passage d'adaptation (p33 et p35) dans les mêmes conditions.

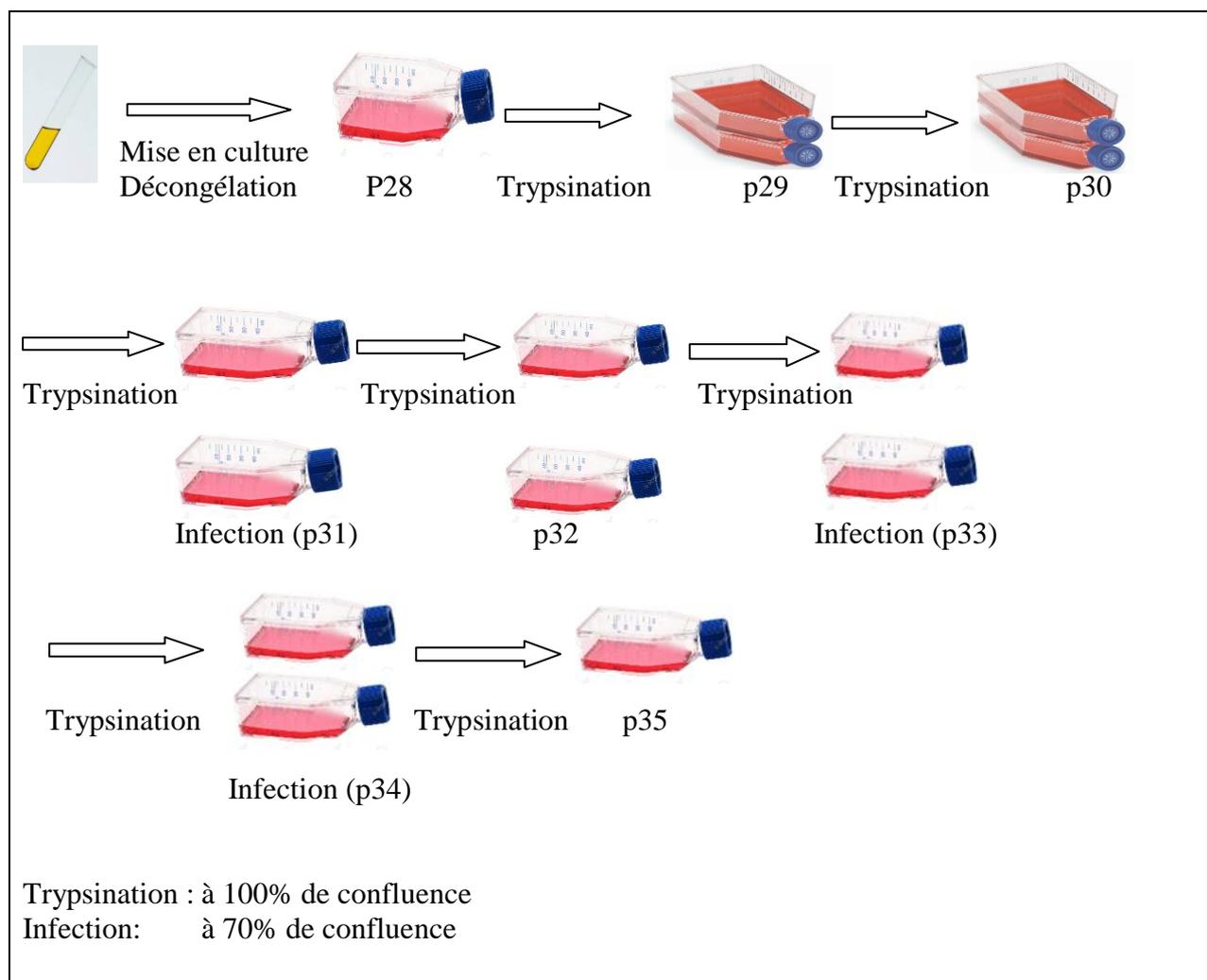


Figure 9. Plan total des trypsinations et des infections

III.5. Récolte des suspensions virales

Retirer les boîtes de l'étuve dès que l'ECP atteint 80% de la couche cellulaire. Les cellules sont alors soumises à un cycle de 3 phases de congélation/décongélation pour casser les cellules et libérer le maximum de particules virales dans le milieu. Puis les suspensions virales récoltées sont clarifiées par centrifugation à 2.500 tr/mn à +4°C pendant 10 min.

Le surnageant est conservé à -20°C pour l'évaluation du titrage et pour les passages ultérieurs.

III.6. Titrage viral

Le titrage de la suspension du virus claveleux est déterminé par la mise en œuvre de la technique de l'effet cytopathique (ECP). Le titre d'une suspension est exprimé en nombre de DICT50/ml ou le nombre de doses infectieuses par ml de suspension virale, capable de lyser 60 à 80% des cellules inoculées.

- **Technique du titrage de la suspension virale**

- **Étape 1** : préparation des dilutions de la suspension virale à titrer :

Une série des dilutions de la suspension virale de 10^1 à 10^6 dans le milieu DMEM sans SVF.

Chaque dilution pour une colonne

Les deux dernières colonnes correspondent au :

- Témoin cellules (T-) : 100µ de suspension cellulaire + 900 ml de milieu DMEM.
- Témoin viral (T+) : 100µ de suspension cellulaire + 900 ml de suspension virale mère.

- **Étape 2** : préparation de la suspension cellulaire BSR :

Consiste à remplir toute la microplaque p96 par la suspension cellulaire à une concentration de 10^5 Cellules/ml, avec un ensemencement de 100µ dans chaque puits de microplaque p96 ; on aura donc 10^4 cellules/puits. Puis rajouter un volume de 100µ des dilutions de la suspension virale de 10^1 à 10^6 dans les colonnes de 01 à 06 de la p96, avec 8 répétitions de A à H dans chaque colonne.

Le milieu DMEM est utilisé avec une concentration finale 2,5% SVF pour préparer la microplaque p96.

L'incubation des microplaques à l'étuve à 37°C est réalisée en atmosphère enrichie à 5% CO₂.

La plaque fait ensuite l'objet d'une observation quotidienne pendant 7 jours ; deux lectures de l'ECP sont faites au 5^{ème} et 7^{ème} jour au microscope photonique inversé. Les résultats sont notés sur la feuille de lecture (Annexe 7 et 8).

- **Lecture finale du titrage**

Le titre de la suspension virale est calculé selon la formule de Spearman-Kärber (Karber, 1931), qui fournit le log de la dilution capable de lyser les cellules (apparition d'ECP) dans 50% des cupules.

La formule suivante est utilisée pour le calcul de la dose infectieuse 50% :

$\text{Log}_{10} \text{ Dilution Terminale} = -X - d \left(\sum \frac{r_i}{n_i} - 0.5 \right)$ où :

- **X** : log₁₀ de l'inverse de la plus faible dilution pour laquelle tous les puits sont positifs.
- **D** : log₁₀ du facteur de dilution.
- **ni** : nombre des puits utilisés à chaque dilution après soustraction des puits éliminés.
- **Ri** : nombre de puits positifs (parmi ni).

Résultats et discussions

Résultats et discussion

I. Résultats

• Après la trypsinisation

Le tapis cellulaire est dispersé après les lavages par la trypsine.

Au cours de 24 heures, le tapis cellulaire devient semi-confluent, avec des vides par endroits dans le tapis cellulaire. Les cellules vont ensuite poursuivre leur prolifération jusqu'à atteindre 80-90% de confluence 48 heures après. Les BSR augmentent rapidement de volume et le tapis devient confluent et prêt à être repiqué une autre fois (Figure 10B)

Les observations au microscope pour l'analyse morphologiques des BSR après l'inoculation par poxvirus montrent les caractéristiques suivantes :

- **Au 1^{er} jour post-infection** : La forme des BSR est arrondie, régulière et gonflée. Ce changement de forme des fibroblastes est expliqué par l'épuisement des nutriments cytoplasmiques des cellules qui induit l'assemblage et la maturation des virions, avec apparition de quelques plages de lyse (début d'ECP) (Figure 10C)
- **Au 2^{ème} jour post-infection** : Des noyaux présentent des zones claires de contour mal défini. Cette vacuolisation du noyau est accompagnée d'une margination de la chromatine.

Le tapis cellulaire est à environ 40% d'ECP (Figure 10D)

- **Aux 3^{èmes} et 4^{èmes} jours post-infection** : Le cytoplasme disparaît, la cellule est réduite à cause d'une réduction de l'activité cellulaire par l'effet du virus (formation et libération des virions) et l'ECP atteint 60% de destruction du tapis cellulaire (Figure 10EF)

À partir du 3^{ème} jour post-infection intervient la phase de production virale proprement dite, durant laquelle le titre infectieux augmente rapidement, et la lyse cellulaire peut aussi être un critère pour évaluer la quantité de la production virale (Emma, 2009).

L'idéal est de récolter les boîtes des cellules infectées par le poxvirus lorsque 60 à 80% de destruction du tapis par ECP est atteinte (O.I.E, 2010).

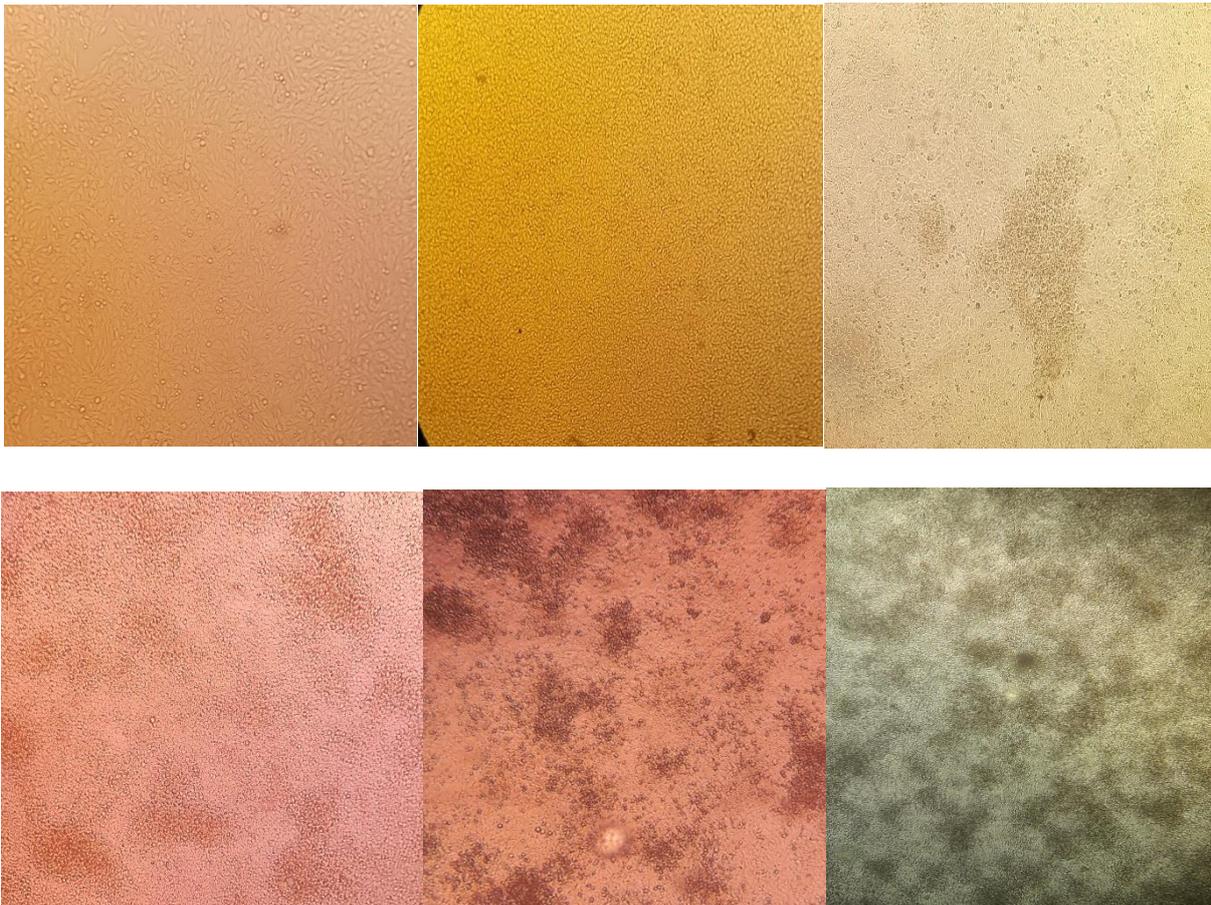


Figure 10 : Lecture d'apparition d'effet cytopathique (ECP) du poxvirus sur des boîtes de cellules BSR inoculées (×40)

- A. Tapis de cellules BSR non inoculées (témoin)
- B. Tapis de cellules BSR après 24 heures de trypsination
- C. Tapis de cellules BSR inoculées, au 1^{er} jour post-infection, avec un foyer d'ECP
- D. Tapis de cellules BSR inoculées, au 2^{er} jour post-infection, à environ 40% d'ECP
- E. Tapis de cellules BSR inoculées, au 3^{er} jour post-infection
- F. Tapis de cellules BSR inoculées, au 4^{er} jour post-infection, entre 60% et 80% d'ECP.

- **Étude de la cinétique du titre viral au cours des passages successifs d'adaptation**

Une DCIT50% correspond à la dilution du virus capable de produire un ECP sur 50% des plages cellulaires infectées par cette dilution.

On calcule le titre viral final par la méthode de Karber comme suit :

$$\text{Log10 Dilution Terminale} = -X - d \left(\sum \frac{r_i}{n_i} - 0,5 \right)$$

- **X** : log10 de l'inverse de la plus faible dilution pour laquelle tous les puits sont positifs. Dans ce cas : $X = \log 10^{-(-4)} = \log 10^{+4} = +4$.

- **d** : log10 de facteur de dilution, $d = \log 10 = 1$.
- **ni** : nombre de puits utilisées à chaque dilution après soustraction des puits éliminés ; dans ce cas $n_i = 8$ (8 répétitions).
- **ri** : nombre des puits positifs (parmi n_i).

Donc : $\text{Log}_{10} \text{D.T.} = -4 - 1(35/8-0.5)$.

$$\text{Log}_{10} \text{D.T.} = -7.875 \quad \text{D.T.} = 10^{-7.875}$$

D'où on peut calculer ce titre : $T = -\log_{10} \text{D.T.}$

$$T = 10^{-D.T.}$$

$$T = 10^{-(-7.875)} \quad T = 10^{7.875} \text{ DICT}_{50} / 100 \mu\text{l.}$$

$$T = 10^{8.875} \text{ DICT}_{50} / \text{ml.}$$

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	T^-	T^+
A	+	+	+	+	+	-	-	+
B	+	+	+	+	+	-	-	+
C	+	+	+	+	-	-	-	+
D	+	+	+	+	+	-	-	+
E	+	+	+	+	-	-	-	+
F	+	+	+	+	+	-	-	+
G	+	+	+	+	+	-	-	+
H	+	+	+	+	+	-	-	+
ri/ni	8/8	8/8	8/8	8/8	3/8	0/8		

Figure 11 : Exemple d'une lecture de microplaque de titrage à J4 (puits 3)

- **Titration des suspensions virales récoltées**

Le titrage des suspensions virales récoltées et clarifiées est effectué après chaque passage d'adaptation sur cellules BSR. Les titrations ont donné les résultats représentés dans le tableau et le graphe ci-dessous et exprimés en $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$ par rapport au temps.

Tableau 4. Résultats de titrage des suspensions virales récoltées au cours des passages d'adaptation

Passages	Titrage sur BSR
Titre initial	$10^{4.5}$ DICT50/ml
Titre du 1 ^{er} passage	$10^{8.875}$ DICT50/ml
Titre du 2 ^{ème} passage	$10^{9.5}$ DICT50/ml
Titre du 3 ^{ème} passage	$10^{9.25}$ DICT50/ml

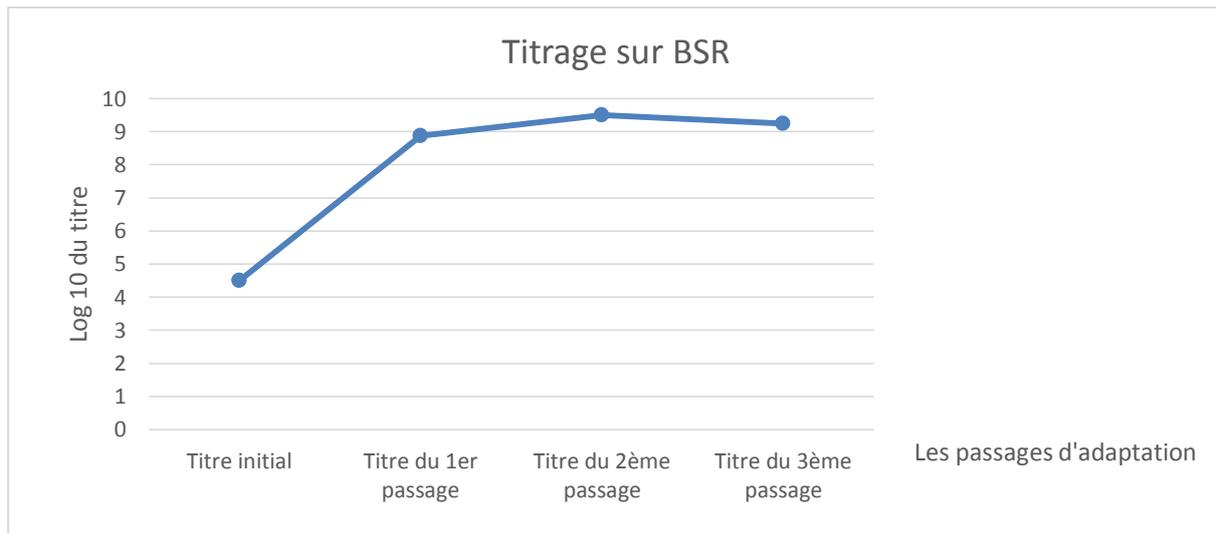


Figure 12. Cinétique de rendement viral au cours des passages d'adaptation

II. Discussion.

En comparant l'apparition d'ECP sur des cellules BSR avec celles sur cellules BHK21 et tout en gardant les mêmes conditions d'adaptation, on obtient les résultats suivants :

- La destruction du tapis cellulaire atteint environ 80% aux 4^{ème} et 5^{ème} jours d'inoculation sur cellules BHK21,
- Par contre, concernant les cellules BSR, la destruction se fait à partir du 1^{er} passage et atteint 40% au 2^{ème} jour post-infection. On peut dire que le support cellulaire BSR devient de plus en plus permissif au poxvirus à partir du 1^{er} passage d'adaptation.

Il est préférable de récolter les boîtes infectées avec le poxvirus entre 60 et 80% d'ECP, c'est-à-dire avant la libération totale des virions (O.I.E., 2010). De ce fait, on peut garantir une suspension virale ayant un titre élevé et qui sert d'inoculum pour le passage suivant.

La suspension virale utilisée au cours du 1^{er} passage d'adaptation titre à $10^{1.875}$ **DICT50/ml** sur cellules BHK21. En revanche, le tirage de cette suspension sur cellules BSR donne un titre de $10^{8.875}$ **DICT50/ml**. Cet écart important peut être expliqué par le fait que les cellules BSR sont plus permissives et plus sensibles au poxvirus que les cellules BHK21.

Les suspensions récoltées et titrées après la réalisation du 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème} passage d'adaptation donne des titres de $10^{8.875}$ **DICT50/ml**, $10^{9.5}$ **DICT50/ml**, $10^{9.25}$ **DICT50/ml**. L'augmentation exponentielle du titre viral au 1^{er} et 2^{ème} passage d'adaptation est due à la sensibilisation des cellules BSR vis-à-vis de la suspension virale utilisée. D'autre part, ce rendement viral diminue au 3^{ème} passage. On remarque aussi que le titre viral augmente relativement avec l'avancement des passages. Ceci est probablement dû au fait que les cellules BSR deviennent plus permissives car le virus est devenu de plus en plus adapté à ce support cellulaire.

Il faut aller au maximum possible de passages d'adaptation de la souche vaccinale RM65 sur les cellules BHK21 pour avoir une suspension virale plus adaptée, avec un meilleur rendement viral. Par contre, les cellules BSR sont un meilleur siège pour l'adaptation du poxvirus, qui ne nécessite pas plusieurs passages viraux parce que l'ECP atteint 40% au 2^{ème} jour post-infection, donc le titre viral est augmenté aux 1^{er} et 2^{ème}s passages d'adaptation.

Conclusion

Conclusion

A travers cette étude on estime que les cellules BSR peuvent être utilisées comme un support pour la production du vaccin anti claveléux car les résultats trouvés sont significatifs et montrent que la souche vaccinale RM65 peut être adaptée sur les BSR.

Le titre viral élevé rapidement montre que les BSR sont trop sensibles et permissifs à l'adaptation de la souche vaccinale RM65.

Cette étude peut nous donner la possibilité de faire la production du vaccin anti claveléux, les avantages seront économiques (la diminution du coût et de la durée de la production) avec la possibilité de ne pas utiliser des fœtus d'où provient les RM.

Lors de la purification des BSR malgré que le titre viral est élevé mais y'aura une division immunologique donc moins d'anticorps anti claveléux.

Il faut explorer le volume immunologique avant d'utiliser les BSR comme support vaccinal.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Achour et Boughedour R., Bouhbal A., Guechtouli A., (2000) : Etude comparative de quelque souche atténuée de virus de la clavelée et d'un vaccin sensibilisé. *Rev.sci. Tech Off. Int. Epiz.* 19 (3) :733-783.

Angba et Pierre, 1979 : la clavelée en Côte-d'Ivoire, p. 334. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 1983, 36 (4) : 333-336.

Anonyme 01, 2018 : Danger sanitaire de 1ère et 2ème catégories chez les ruminants 1. p. 59-60-61.

Anonyme 02, 2018 : Fédération régionale des groupements de défense sanitaire du bétail de corse (FRGDSB20). Clavelée : un point sur la situation épidémiologique en Grèce.

Archives de l'IPA, 2000/2003 : Archives de l'Institut Pasteur, T-64, 200/2003. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1983, 36 (4) : 333-336.

Barrett, P.N., Mundt W., Kistner O., Howard M.K. (2019). Vero cell platform in vaccine production : moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert. Rev. Vaccines* 8 (5) : 607-18.

Belkessam K., 1977 : Contribution à l'étude de la clavelée en Algérie, thèse pour le doctorat vétérinaire, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, p. 23 et 50-51.

Bhanu Prakash V.A., Indrani B.K., Hosamani M.A., Singh R.K., 2006 : The current status of sheep pox disease. A Division of Virology, Indian Veterinary Research Institute, Mukteswar. *India comparative Immunology. Microbiological and Infectious Diseases* (29) : 27-60.

Boos CF, 2009 : Le nez croûteux : diagnostic différentiel des affections du muflon et des naseaux chez les ruminants. Thèse pour le doctorat vétérinaire, faculté de médecine de Créteil, p. 66.

CFSPH, 2017 : Clavelée et variole caprine, Capripoxvirus infections, Capripox, p. 3

Chantal, 2006 : Guide pratique de diagnostic et de gestion des épizooties p. 32.

Da Silva Teixeira M.F., Lambert V., Mselli-Lakahl L., Chettab A., Chebloune Y., Mornex J.f., 1997 : L'immortalisation de fibroblastes caprins permissive pour la réplication des lentivirus de petits ruminants. AM.J. Vet. Res. (58) : 579-584.

Diallo et Viljoen, 2007 : Genus *Capripoxvirus*, poxviruses, Birkhauser Verlag Basel/Switzerland, p. 167-181.

Duigou A., 2005 : Maîtrise des procédés de culture cellulaire pour la production de vaccins, thèse de doctorat, faculté de pharmacie, université Hanri Polncare, Nancy 1.145 pages.

Diallo A., 2011. Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of Capripoxviruses. Journal of Virological Methods. 171 : 134-140.

FAO, 2000 : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Reconnaître la clavelée – Manuel de terrain, p. 7-21.

Fassi-Fehri M., El Harrak M., Bertin F., 1983 : Étude comparée du développement de deux souches vaccinales du virus claveleux sur cellules testiculaires et rénales d'agneau : Résultats préliminaires. Rev. Sci. Tech. Int. Epiz. 2 (2) : 499-507.

Fassi-Fehri M., 1988 : La clavelée, les maladies infectieuses du mouton, Tome 2, actes Ed., p. 5-27.

Fassi-Fehri M et Lefèvre PC, 2003 : Principales maladies parasitaires du bétail, Europe et régions chaudes. Volume 1, p. 415-424.

Haller S., Peng C., McFadden G., Rothenberg S., 2013 : Poxviruses and the evolution of host range and virulence. Infection, genetics and evolution. 21 (2014) : 15-40.

Hamidouche M., Saada N., 2010 : Caractérisation cytogénétique et morphologique des cellules BSR et TIGEF immortalisées *in vitro*, projet de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme d'ingénieur d'état, Université de M'Hamed Bouguerra, Boumerdes.

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

Inoshima, 2000 : Contribution au développement de vaccin capripoxviraux recombinants contre la fièvre catarrhale ovine, 2007, p. 61.

Institut Pasteur France, 2011 : Dossier technique Clavax, du laboratoire de production et de développement des vaccins viraux vétérinaires, unité de production de vaccins anti-claveleux, annexe Kouba, Alger.

Blancou J., 1999 : Histoire de la surveillance et du contrôle de la clavelée jusqu'au XIX^e siècle, p. 04.

Jora 2006 : Journal Officiel de la République Algérienne, Décrit présidentiel N°16 du 15 mars (Art. 2 - les maladies animales à déclaration obligatoire p. 19).

Lamien, C., Lelenta M., Goger W., Silber R., Tuppurainen E., Matijevic M., Luckins A., Diallo A., 2011 : Real-time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of Capripoxviruses. Journal of Virological Methods 171 (2011) : 134-140.

Blajan L, 1984 : Maladies des ovins et caprins ayant une importance économique dans la zone méditerranéenne, p. 195. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1984, 3 (1), 191-208

Lefèvre, 1983 : La variole ovine (clavelée) et la variole caprine, p. 09, 13 et 111.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., 2005 : Biologie moléculaire de la cellule (5th Ed.), New York : W.H. freeman and co, 236-237 pages.

Mirakabadi A. Z., Moradhaseli S., 2013 : Comparative cytotoxic evaluation of free and sodium alginate nanoparticle-encapsulated ICD-85 on primary lamb kidney cells. Iran J. Cancer Prev. 6 (3) : 151-159.

Moss, Goebel, 1992 : Contribution au développement de vaccins Capripoxviraux recombinants contre la fièvre catarrhale ovine, p. 58.

Murty et Singh, 1971 : Epidemiological studies on an outbreak of sheep pox in a mixed flock in Uttar Pradesh. Indian J. Anim. Sci., 41, 1072-1079.

OIE, 2008 : Clavelée et variole caprine, Manuel terrestre de l'OIE 2008, chapitre 2.7.14, p. 1157-1168.

OIE, 2013 : Clavelée et variole caprine, code sanitaire pour les animaux terrestres, chapitre 14.10, p. 719-721.

OIE, 2018 : Clavelée et variole caprine 2018 © OIE. Article 14.9.4 et 14.9.3 du code sanitaire pour les animaux terrestres Code sanitaire pour les animaux terrestres - 22/02/2019.

Perrin A.A., 2007 : Contribution au développement de vaccins capripoxviraux recombinants contre la fièvre catarrhale ovine. Thèse de doctorat. Faculté de sciences et techniques du Languedoc, Université de Montpellier, 233 pages.

Salah H et Yassa L., 1999 : Vaccin anti-claveleux sur cultures cellulaires : production et contrôles, essais cliniques. Projet de fin d'étude en Microbiologie, université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, Alger, 42 pages.

Stéphane P., Brigitte A., Jeannin P., Lelièvre J.D., 2015 : Mécanisme d'action des vaccins, rôle des adjuvants, p. 3

Tortora GJ, Funke BR, Case C, Martin L., 2003 : Introduction à la microbiologie, éditions ERPI, Québec, Canada, 9945 pages, ISBN 978-7613-1345-2.

Van Regenmortel, M. H., C. M. Fauquet, D. H.L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M.Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J.McGeoch, C. R. Pringle, and R. E. Wickner., 2000 : Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego, California. Academic Press.

Zhou T., Jia H., Chen G., He X., Fang Y., Wang X., Guan Q., Zeng S., Cui Q., Jing Z.,
2012 : Phylogenetic analysis of chinees sheep pox and goat pox virus isolates. Virology journal
(9) : p. 1-25.

Sites web:

Aqua portail, 2019 : <https://www.aquaportail.com/definition-13728-culture-cellulaire.html>

CFSPH, 2017 : http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/ImageDB/SGP/SGP_010.jpg

<http://www.frgdsb20.fr/2018/05/03/clavelee-un-point-sur-la-situation-epidemiologique-en-grece/>

Guide des vaccinations., 2012 : définition et principe de la vaccination

<http://www.inpes.sante.fr/10000/themes/vaccination/guide-vaccination-2012/pdf/guidevaccination2012>

Principes et bases immunologique de la vaccination.

pdf/xml=http://search.atomz.com/search/pdfhelper.tk ?sp0=1

Figaro, 2018 : La vaccination

<http://sante.lefigaro.fr/mieux-etre/vaccination-depistage/vaccination/quels-types-vaccins>.

Magniez, 2008 : culture cellulaire.

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

OSAV, 2013 : morphologie du virus (site internet).

Adresse url : <http://www.blv.admin.ch>

Overblog, 2018) : <http://www.technobio.fr/article-16526675.html>

P.C. Lefevre, (1983) : clavelée et variole caprine

Slideplayer, 2019 : <http://slideplayer.fr/slide/241611>

<http://agriculture.gouv.fr/guide.epizooties>

Vaccination-info. BE, 2019 : <https://www.vaccination-info.be/histoire-de-la-vaccination>

www.poxvirus.org

Annexes

Décret exécutif n° 06-118 du 12 Safar 1427 correspondant au 12 mars 2006 complétant le décret exécutif n° 88-252 du 31 décembre 1988 fixant les conditions d'exercice à titre privé des activités de médecine vétérinaire et de chirurgie des animaux.

Le Chef du Gouvernement,

Sur le rapport du ministre de l'agriculture et du développement rural,

Vu la Constitution, notamment ses articles 85-4° et 125 (alinéa 2) ;

Vu la loi n° 88-08 du 26 janvier 1988 relative aux activités de médecine vétérinaire et à la protection de la santé animale ;

Vu le décret présidentiel n° 04-136 du 29 Safar 1425 correspondant au 19 avril 2004 portant nomination du Chef du Gouvernement ;

Vu le décret présidentiel n° 05-161 du 22 Rabie El Aouel 1426 correspondant au 1er mai 2005 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 88-252 du 31 décembre 1988, complété, fixant les conditions d'exercice à titre privé, des activités de médecine vétérinaire et de chirurgie des animaux ;

Vu le décret exécutif n° 90-12 du 1er janvier 1990, modifié et complété, fixant les attributions du ministre de l'agriculture ;

Vu le décret exécutif n° 90-240 du 4 août 1990 fixant les conditions de fabrication, de mise en vente et de contrôle des médicaments vétérinaires ;

Décète :

Article 1er. — Le présent décret a pour objet de compléter les dispositions du décret exécutif n° 88-252 du 31 décembre 1988, complété, susvisé.

Art. 2. — Il est inséré dans les dispositions du décret exécutif n° 88-252 du 31 décembre 1988, complété, susvisé, un *article 3 ter* rédigé comme suit :

«*Art. 3 ter.* — Le vétérinaire exerçant à titre privé peut être suspendu à titre conservatoire par l'autorité vétérinaire nationale en attendant de statuer sur sa situation pour un délai allant de trois (3) mois à une (1) année, pour les cas suivants :

— vente de médicaments vétérinaires à l'éleveur à l'exception des prescriptions liées au dernier alinéa de l'article 40 du décret exécutif n° 90-240 du 4 août 1990, susvisé ;

— mise à la disposition de l'éleveur de produits vétérinaires injectables ;

— utilisation de médicaments vétérinaires périmés ;

— procéder à des essais cliniques sans autorisation préalable de l'autorité vétérinaire nationale ;

— détention et utilisation de produits vétérinaires ne bénéficiant pas d'autorisation de mise sur le marché ;

— délivrance de certificats, de documents officiels et d'attestations de complaisance ;

— omettre de signaler la fermeture du cabinet vétérinaire à l'inspecteur vétérinaire de wilaya pour une période dépassant les dix (10) jours ;

— se faire remplacer par une personne non autorisée à pratiquer la médecine vétérinaire ;

— manquements du vétérinaire considérés comme fautes professionnelles par l'autorité vétérinaire nationale ;

— la non-déclaration de maladies animales à déclaration obligatoire ;

— la non transmission périodique du bilan d'activités vétérinaires à l'autorité vétérinaire nationale ;

— mauvaise conduite du vétérinaire envers les animaux lors de manipulations ».

Art. 3. — Le présent décret sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 12 Safar 1427 correspondant au 12 mars 2006.

Ahmed OUYAHIA.

-----★-----

Décret exécutif n° 06-119 du 12 Safar 1427 correspondant au 12 mars 2006 modifiant et complétant le décret exécutif n° 95-66 du 22 Ramadhan 1415 correspondant au 22 février 1995 fixant la liste des maladies animales à déclaration obligatoire et les mesures générales qui leur sont applicables.

Le Chef du Gouvernement,

Sur le rapport du ministre de l'agriculture et du développement rural ,

Vu la Constitution, notamment ses articles 85-4° et 125 (alinéa 2) ;

Vu la loi n° 85-05 du 16 février 1985, modifiée et complétée, relative à la protection et à la promotion de la santé ;

Vu la loi n° 88-08 du 26 janvier 1988 relative aux activités de médecine vétérinaire et à la protection de la santé animale ;

Vu la loi n° 90-08 du 7 avril 1990, complétée, relative à la commune ;

Vu la loi n° 90-09 du 7 avril 1990, complétée, relative à la wilaya ;

Vu le décret présidentiel n° 04-136 du 29 Safar 1425 correspondant au 19 avril 2004 portant nomination du Chef du Gouvernement ;

Vu le décret présidentiel n° 05-161 du 22 Rabie El Aouel 1426 correspondant au 1er mai 2005 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 88-252 du 31 décembre 1988, complété, fixant les conditions d'exercice à titre privé des activités de médecine vétérinaire et de chirurgie des animaux ;

Vu le décret exécutif n° 90-12 du 1er janvier 1990, modifié et complété, fixant les attributions du ministre de l'agriculture ;

Vu le décret exécutif n° 95-66 du 22 Ramadhan 1415 correspondant au 22 février 1995, modifié et complété, fixant la liste des maladies animales à déclaration obligatoire et les mesures générales qui leur sont applicables ;

Décète :

Article 1er. — Le présent décret a pour objet de modifier et compléter les dispositions du décret exécutif n° 95-66 du 22 Ramadhan 1415 correspondant au 22 février 1995, modifié et complété, susvisé.

Art. 2. — Les dispositions de l'article 2 du décret exécutif n° 95-66 du 22 Ramadhan 1415 correspondant au 22 février 1995, modifié et complété, susvisé, sont modifiées et complétées comme suit :

"Art. 2. — Les maladies animales à déclaration obligatoire sont les suivantes :

- La fièvre aphteuse ;
- La peste bovine ;
- La peste équine ;
- La péripneumonie contagieuse bovine ;
- La rage chez toutes les espèces ;
- La clavelée et la variole caprine ;
- La maladie de Newcastle ;
- L'influeza aviaire ;
- La fièvre charbonneuse chez toutes les espèces de mammifères ;
- La fièvre catarrhale du mouton ;
- La tuberculose bovine ;
- La brucellose dans les espèces bovine, ovine, caprine et cameline ;
- L'anémie infectieuse des équidés ;
- La métrite contagieuse équine ;
- La pourriture ;
- La morve ;
- La rhinotrachéite infectieuse bovine ;
- La leucose bovine enzootique ;
- La myiase à *Cochliomyia Hominivorax* ;
- La myiase à *Chrysomya Bezziana* ;
- La campylobactériose génitale bovine ;
- La trichomonose bovine ;
- L'échinococcose/hydatidose ;
- La cysticercose ;
- Le charbon symptomatique ;
- L'avortement enzootique des brebis ;

- La gale des équidés ;
- La paratuberculose ;
- La fièvre Q ;
- La leptospirose bovine ;
- La bronchite infectieuse aviaire ;
- La maladie de Marek ;
- Le choléra aviaire ;
- La bursite infectieuse (maladie de Gumboro) ;
- La variole aviaire ;
- L'ornithose/psittacose ;
- les leucoses aviaires ;
- La myxomatose ;
- La maladie hémorragique virale du lapin ;
- La tularémie ;
- La varroase des abeilles ;
- La loque européenne ;
- La loque américaine ;
- La nosémosse ;
- L'acariose des abeilles (acarapisose) ;
- L'infestation des abeilles par l'acarien *Tropilaelaps* ;
- L'infestation de la ruche par le coléoptère *Aethina Tumida* ou " petit scarabée de la ruche " ;
- La variole cameline ;
- La trypanosomose des camelins à *T. evansi* (surra) ;
- la trypanosomose (transmise par la mouche tsé-tsé) ;
- La leishmaniose ;
- La peste des petits ruminants ;
- L'encéphalopathie spongiforme des bovins ;
- La fièvre de la vallée du Rift ;
- Les Salmonelloses aviaires à *Salmonella Enteritidis*, *Typhimurium*, *Arizona*, *Dublin*, *Paratyphi* et *Pullorum Gallinarum* ;
- La tremblante ;
- Les encéphalites équines sous toutes leurs formes ;
- Les salmonelloses bovines ;
- La listériose ;
- La rhinopneumonie des équidés ;
- La maedi-Visna ;
- La piroplasmose ;
- La babésiose bovine ;
- L'encéphalomyélite aviaire ;
- La rhinotrachéite infectieuse aviaire ;
- L'entérite hémorragique de la dinde ;
- Le coryza gangréneux ;
- L'adénomatose pulmonaire ovine ;
- La maladie de Nairobi ;
- La salmonellose ovine (*S. abortusovis*) ;
- L'épididymite ovine (*Brucella ovis*) ;
- L'entérite virale du canard ;
- L'hépatite virale du canard ;
- La toxoplasmose ;
- La lymphangite épizootique ;

- L'artérite virale équine ;
- La variole équine ;
- La stomatite vésiculeuse ;
- La dermatose nodulaire contagieuse ;
- La cowdriose ;
- La trichinellose ;
- L'anaplasmose bovine ;
- La dermatophilose ;
- La septicémie hémorragique ;
- La théilériose ;
- L'arthrite/encéphalite caprine (CAE) ;
- L'agalaxie contagieuse ;
- La pleuropneumonie contagieuse caprine ;
- La grippe équine ;
- La laryngotrachéite infectieuse aviaire ;
- La tuberculose aviaire ;
- La mycoplasmosse aviaire (*M. Gallisepticum*) ;
- La chlamydirose aviaire. "

Art. 3. — Les dispositions de l'article 4, 3^{ème} tiret du décret exécutif n° 95-66 du 22 Ramadhan 1415 correspondant au 22 février 1995, modifié et complété, susvisé, sont modifiées comme suit :

"Art. 4. — Un animal est déclaré atteint d'une maladie à déclaration obligatoire :

.....(Sans changement).....

— lorsque la maladie est confirmée par un laboratoire agréé par le ministre chargé de l'agriculture".

Art. 4. — Les dispositions de l'article 10 (2^{ème} alinéa) du décret exécutif n° 95-66 du 22 Ramadhan 1415 correspondant au 22 février 1995, modifié et complété, susvisé, sont modifiées comme suit :

"Art. 10. —(Sans changement).....

L'arrêté doit comporter la déclaration des trois (3) zones concentriques prévues par les dispositions de l'article 69 de la loi n° 88-08 du 26 janvier 1988, susvisée".

Art. 5. — Le présent décret sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 12 Safar 1427 correspondant au 12 mars 2006.

Ahmed OUYAHIA.

DECISIONS INDIVIDUELLES

Décret présidentiel du 28 Moharram 1427 correspondant au 27 février 2006 mettant fin aux fonctions du directeur général de la solidarité nationale au ministère de l'emploi et de la solidarité nationale.

Par décret présidentiel du 28 Moharram 1427 correspondant au 27 février 2006, il est mis fin aux fonctions de directeur général de la solidarité nationale exercées par M. Abdallah Bouchenak-Khelladi au ministère de l'emploi et de la solidarité nationale, appelé à exercer une autre fonction.

-----★-----

Décret présidentiel du 28 Moharram 1427 correspondant au 27 février 2006 mettant fin aux fonctions du directeur général de l'office national du tourisme.

Par décret présidentiel du 28 Moharram 1427 correspondant au 27 février 2006, il est mis fin aux fonctions de directeur général de l'office national du tourisme exercées par M. Abdelaali Tir, appelé à exercer une autre fonction.

Décret présidentiel du 28 Moharram 1427 correspondant au 27 février 2006 portant nomination du secrétaire général du ministère des participations et de la promotion des investissements.

Par décret présidentiel du 28 Moharram 1427 correspondant au 27 février 2006, M. Driss Tandjaoui est nommé secrétaire général du ministère des participations et de la promotion des investissements.

-----★-----

Décret présidentiel du 28 Moharram 1427 correspondant au 27 février 2006 portant nomination du secrétaire général du ministère de la culture.

Par décret présidentiel du 28 Moharram 1427 correspondant au 27 février 2006, M. Abdelaali Tir est nommé secrétaire général du ministère de la culture.

-----★-----

Décret présidentiel du 28 Moharram 1427 correspondant au 27 février 2006 portant nomination du secrétaire général du ministère de l'emploi et de la solidarité nationale.

Par décret présidentiel du 28 Moharram 1427 correspondant au 27 février 2006, M. Abdallah Bouchenak-Khelladi est nommé secrétaire général du ministère de l'emploi et de la solidarité nationale.

CHAPITRE 14.9.

CLAVELÉE ET VARIOLE CAPRINE

Article 14.9.1.

Considérations générales

Aux fins de l'application du *Code terrestre*, la *période d'incubation* de la clavelée et de la variole caprine est fixée à 21 jours.

Les normes pour les épreuves de diagnostic et les vaccins sont décrites dans le *Manuel terrestre*.

Article 14.9.2.

Pays indemne de clavelée et de variole caprine

Un pays peut être considéré comme indemne de clavelée et de variole caprine lorsqu'il est établi que cette maladie n'y existe pas depuis au moins trois ans.

Ce délai est ramené à six mois après l'*abattage* du dernier animal atteint de la maladie pour les pays pratiquant l'*abattage sanitaire*, associé ou non à la *vaccination* contre la clavelée et la variole caprine.

Article 14.9.3.

Zone infectée par la clavelée et la variole caprine

Une *zone* sera considérée comme infectée par la clavelée et la variole caprine jusqu'à ce qu'il se soit écoulé :

- 1) 21 jours au moins après la confirmation du dernier *cas* et l'achèvement des opérations d'*abattage sanitaire* et de *désinfection*, ou
- 2) six mois après la guérison clinique ou la *mort* du dernier animal atteint de la maladie si l'*abattage sanitaire* n'y a pas été pratiqué.

Article 14.9.4.

Échanges de marchandises

Les *Autorités vétérinaires* des pays indemnes de clavelée et de variole caprine peuvent interdire l'importation ou le transit par leur territoire, en provenance de pays considérés comme infectés par la clavelée et la variole caprine, de tout ovin domestique et de tout caprin domestique.

Article 14.9.5.

Recommandations relatives aux importations en provenance de pays indemnes de clavelée et de variole caprine

Pour les ovins et caprins domestiques

Les *Autorités vétérinaires* doivent exiger la présentation d'un *certificat vétérinaire international* attestant que les animaux :

- 1) ne présentaient aucun signe clinique de clavelée et de variole caprine le jour de leur chargement ;
- 2) ont séjourné depuis leur naissance, ou durant au moins les 21 derniers jours, dans un pays indemne de clavelée et de variole caprine.

Article 14.9.6.

Recommandations relatives aux importations en provenance de pays considérés comme infectés par la clavelée et la variole caprine

Pour les ovins et caprins domestiques

Les *Autorités vétérinaires* doivent exiger la présentation d'un *certificat vétérinaire international* attestant que les animaux :

- 1) ne présentaient aucun signe clinique de clavelée et de variole caprine le jour de leur chargement ;
- 2) ont été maintenus depuis leur naissance, ou durant les 21 derniers jours, dans une *exploitation* dans laquelle aucun *cas* de clavelée et de variole caprine n'a été officiellement rapporté au cours de cette même période, et que cette *exploitation* n'était pas située dans une *zone* infectée par la clavelée et la variole caprine, ou
- 3) ont été maintenus dans une *station de quarantaine* pendant les 21 jours ayant précédé leur chargement ;
- 4) n'ont pas été vaccinés contre la clavelée et la variole caprine, ou
- 5) ont été vaccinés contre la clavelée et la variole caprine 15 jours au moins et 4 mois au plus avant leur chargement, à l'aide d'un vaccin répondant aux normes décrites dans le *Manuel terrestre* (les informations relatives au type de vaccin administré, qu'il contienne un virus inactivé ou un virus vivant modifié, ainsi que celles relatives aux types et souches de virus utilisés pour sa fabrication doivent figurer sur le certificat).

Article 14.9.7.

Recommandations relatives aux importations en provenance de pays indemnes de clavelée et de variole caprine

Pour la semence d'ovins et de caprins

Les *Autorités vétérinaires* doivent exiger la présentation d'un *certificat vétérinaire international* attestant que les mâles donneurs :

- 1) n'ont présenté aucun signe clinique de clavelée et de variole caprine le jour de la collecte de la semence, ni durant les 21 jours suivants ;
- 2) ont séjourné dans un pays indemne de clavelée et de variole caprine.

Article 14.9.8.

Recommandations relatives aux importations en provenance de pays considérés comme infectés par la clavelée et la variole caprine

Pour la semence d'ovins et de caprins

Les *Autorités vétérinaires* doivent exiger la présentation d'un *certificat vétérinaire international* attestant que les mâles donneurs :

- 1) n'ont présenté aucun signe clinique de clavelée et de variole caprine le jour de la collecte de la semence, ni durant les 21 jours suivants ;
- 2) ont été maintenus sur le territoire du *pays exportateur*, pendant les 21 jours ayant précédé la collecte de semence, dans un *centre d'insémination artificielle* ou une *exploitation* où aucun *cas* de clavelée et de variole caprine n'a été officiellement rapporté au cours de cette même période, et que ce *centre d'insémination artificielle* ou cette *exploitation* n'était pas situé dans une *zone* infectée par la clavelée et la variole caprine ;
- 3) n'ont pas été vaccinés contre la clavelée et la variole caprine, ou
- 4) ont été vaccinés contre la clavelée et la variole caprine à l'aide d'un vaccin répondant aux normes décrites dans le *Manuel terrestre* (les informations relatives au type de vaccin administré, qu'il contienne un virus inactivé ou un virus vivant modifié, ainsi que celles relatives aux types et souches de virus utilisés pour sa fabrication doivent figurer sur le certificat).

Article 14.9.9.

Recommandations relatives aux importations en provenance de pays considérés comme infectés par la clavelée et la variole caprine

Pour les peaux, fourrures, laines et poils d'ovins ou de caprins

Les *Autorités vétérinaires* doivent exiger la présentation d'un *certificat vétérinaire international* attestant que les produits :

- 1) sont issus d'animaux qui n'ont pas séjourné dans une *zone* infectée par la clavelée et la variole caprine, ou
- 2) ont été soumis à un traitement garantissant la destruction du virus de la clavelée et de la variole caprine dans un établissement agréé par l'*Autorité vétérinaire* du *pays exportateur* et placé sous son contrôle.

NOTA BENE : PREMIÈRE ADOPTION EN 1986.



Institut Pasteur d'Algérie

CLAVAX

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

Composition :

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

Indications :

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

Présentation :

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

Mode d'emploi :

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

Posologie :

La dose vaccinale par animal est de 0,5 ml de la suspension reconstituée, à injecter par voie sous-cutanée au niveau de l'ars, à l'arrière du coude.

La dose est la même, quels que soit l'âge, le sexe ou le poids de l'animal.

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

Immunité :

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

Précautions :

Respecter les règles d'asepsie.

Ne vacciner que les sujets en bon état de santé et correctement déparasités.

Effets secondaires :

Une réaction fébrile peut être observée.

Au point d'inoculation peut apparaître un nodule réactionnel, de 2 à 4 cm de diamètre, qui se résorbe en quelques jours.

Délais d'attente :

Aucun.

Conservation :

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

Validité :

12 mois après la date de fabrication.

PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE : DMEM
(DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM)

Le milieu pour cultures cellulaires est préparé à partir de milieu en poudre, fourni par le fabricant sous forme de flacons.

Présentation

Les flacons de milieu en poudre pour la reconstitution d'un litre de milieu
Les flacons de milieu en poudre pour la reconstitution de 5 litres de milieu

Le milieu en poudre doit être :

- Reconstitué dans de l'eau permutée ou purifiée
- Adjonction de bicarbonate de sodium et solution d'antibiotiques-antimycotiques
- Ajusté à pH 7.4
- Stérilisé par filtration sur membrane filtrante de 0.22 μ

MODE OPERATOIRE

- 1- Mesurer 90% du volume final d'eau permutée dans un flacon contenant un barreau aimanté
- 2- Placer le flacon sur agitateur magnétique
- 3- Verser le contenu du flacon de milieu en poudre
- 4- Ajouter du bicarbonate de sodium (NaHCO₃) à raison de 1.2 g/litre¹
- 5- Ajouter la solution d'antibiotiques-antimycotiques à raison de 2 ml/litre
- 6- Laisser tourner sur agitation magnétique jusqu'à dissolution complète
- 7- Ajouter le restant d'eau permutée
- 8- Mesurer le pH sur une petite quantité de milieu prélevée dans un flacon
- 9- Ajuster le pH si nécessaire à 7.4 par adjonction de gouttes d'acide chlorhydrique (HCL)
- 10- Pré filtrer (sous hotte) sur membrane filtrante de 0.45 μ
- 11- Filtrer (sous hotte) sur membrane filtrante de 0.22 μ
- 12- Répartir le milieu, selon convenance, en flacons de 100, 250, ou 500ml
- 13- Placer les flacons à l'étuve (37°C) pour au moins 48h (control de stérilité)
- 14- Conserver les flacons au réfrigérateur a +4°C
- 15- Avant utilisation, ramener à 37°C au bain marie

¹ On peut préparer une plus grande quantité de milieu, en respectant la proportion des additifs (Bicarbonate de sodium et antibiotiques)

PREPARATION DE LA SOLUTION TRYPSINE - VERSENE

MODE OPERATOIRE (Pour la préparation d'un litre de solution)¹

- 1- Préparer une solution de rouge de phénol à 0.5% dans de l'eau permutée
Comme on n'utilisera que 0.4ml/ litre de cette solution dans la préparation finale, il ne sera pas nécessaire d'en faire beaucoup, 50 ml suffiront amplement
Faites dissoudre 0.25g de rouge phénol en poudre dans 50 ml d'eau permutée
- 2- Verser 900 ml d'eau permutée dans un flacon contenant un barreau aimanté
- 3- Peser et ajouter les ingrédients suivants dans les proportions données

NaCl (Chlorure de sodium)	8 g
KCL (Chlorure de potassium)	0.4 g
C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O (Glucose)	1g
NaHCO ₃ (bicarbonate de sodium)	0.58 g
Trypsine (poudre)	0.5 g
Verséne EDTA	0.2 g

2,5g

- 4- Mettre le flacon sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète
- 5- Ajouter 0.4 ml de la solution de rouge phénol
- 6- Ajouter 2 ml de (solution antibiotique- antimycotique)²
- 7- Compléter jusqu'à 1 litre avec de l'eau permutée
- 8- Pré filtrer sous hotte sur membrane filtrante à 0.45μ
- 9- Filtrer sous hotte sur membrane filtrante à 0.22μ
- 10- Répartir en flacons
- 11- Conserver à - 20°C
- 12- Avant utilisation, décongeler et ramener à 37°C au bain marie

¹ On peut préparer une plus grande quantité de solution en respectant la proportion des ingrédients.

² La solution antibiotique-antimycotique est préparée selon la Fiche N° 6

**PREPARATION DE LA SOLUTION
ANTIBIOTIQUE / ANTIMYCOTIQUE**

COMPOSITION

La Solution est constituée du mélange d'un antimycotique, l'Amphotéricine B (Fungizone), et d'une association de deux antibiotiques, soit Kanamycine et Néomycine, soit Gentamycine et Néomycine.

Gentamycine sulfate	2.5 g
Néomycine sulfate	2.5 g
Amphotéricine B	0.28 g
Eau permutée stérile	100 ml

ou

Kanamycine monosulfate	5 g
Néomycine sulfate	2.5 g
Amphotéricine B	0.28 g
Eau permutée stérile	100 ml

MODE OPERATOIRE

- 1- Mesurer 100 ml d'eau permutée stérile dans un erlen muni d'un barreau aimanté.
- 2- Placer l'erlen sur un agitateur magnétique
- 3- Peser et transférer dans l'erlen chacun des composants (attendre la dissolution complète de chaque composant avant d'ajouter le suivant)
- 4- Pré filtrer sous hotte sur membrane filtrante de 0.45 μ
- 5- Filtrer sur membrane filtrante de 0.22 μ
- 6- Répartir dans des tubes à congélation, à raison de 2 ml/tube
- 7- Conserver les tubes au congélateur a -20°C

DECONGELATION DES CELLULES

Matériel :

- Boîte de culture de 75 cm²
- Pipettes de 1 ml, 25ml
- Milieu d'entretien (Cf. fiche n°1).

Méthode :

Mode opératoire :

1. Récupérer les tubes/ampoules de l'azote liquide et les transférer immédiatement dans un bain-marie à 37°C.
2. Après décongélation complète, essuyer le tube/ampoule avec de l'alcool pour réduire les risques de contamination bactérienne. Transférer ensuite la suspension dans un flacon de culture.
3. Ajouter goutte à goutte un volume suffisant de milieu d'entretien pour la production d'une mono couche (NB : si le tube contient 4×10^6 cellules/ml, 1 ml de suspension devrait suffire pour 1 ou 2 boîtes de 75cm²). La viabilité cellulaire est réduite de façon significative si le milieu d'entretien est rajouté rapidement à cette étape délicate de la manipulation.
4. Incuber les boîtes de culture jusqu'à fixation des cellules aux supports (6-8 heures) ou une nuit à 36°C
5. Eliminer le milieu (se débarrasser du DMSO présent) et ajouter du milieu de croissance frais.

FICHE DE CONTROLE D'ACTIVITE

REFERENCE :

Produit contrôlé :

Référence :

Date de fabrication :

Conditionnement :

Date de début de titrage :

Date de fin de titrage : lecture finale :

Type de cellules utilisées et numéro de passages :

Milieu utilisé :

P₀₁

TITRAGE : Fiche de lecture

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	-						
B	+	+	+	+	-	-						
C	+	+	+	+	-	-						
D	+	+	+	+	+	-						
E	+	+	+	+	+	-						
F	+	+	+	+	+	-						
G	+	+	+	+	+	-						
H	+	+	+	+	+	-						

$\frac{8}{8}$

$\frac{8}{8}$

$\frac{8}{8}$

$\frac{8}{8}$

$\frac{3}{8}$

$\frac{0}{8}$

CALCUL DU TITRE

Méthode de calcul :

Titre final: 0,15
 $T = 10^{8,15} \text{ DICT}_{50} / \text{ml}$

DICT₅₀ /dose

FICHE DE CONTROLE D'ACTIVITE

REFERENCE :

Produit contrôlé :

Référence :

Date de fabrication :

Conditionnement :

Date de début de titrage :

Date de fin de titrage : lecture finale :

Type de cellules utilisées et numéro de passages :

Milieu utilisé :

$P_2 =$

TITRAGE : Fiche de lecture

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+						
B	+	+	+	+	+	-						
C	+	+	+	+	+	-						
D	+	+	+	+	+	-						
E	+	+	+	+	-	+						
F	+	+	+	+	+	-						
G	+	+	+	+	-	-						
H	+	+	+	+	+	-						

[0/00 00/00 00/00 00/00 6/00 2/00]

CALCUL DU TITRE

Méthode de calcul :

Titre final:
 $T = 10^{3.5}$ DICT₅₀ / ml

- DICT₅₀ /dose

FICHE DE CONTROLE D'ACTIVITE

REFERENCE :

Produit contrôlé :

Référence :

Date de fabrication :

Conditionnement :

Date de début de titrage :

Date de fin de titrage : lecture finale :

Type de cellules utilisées et numéro de passages :

Milieu utilisé :

P03

TITRAGE : Fiche de lecture

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	-						
B	+	+	+	+	+	-						
C	+	+	+	+	-	-						
D	+	+	+	+	+	-						
E	+	+	+	+	-	-						
F	+	+	+	+	+	-						
G	+	+	+	+	+	-						
H	+	+	+	+	+	-						

8/8 8/8 8/8 8/8 6/8 0/8

CALCUL DU TITRE

Méthode de calcul :

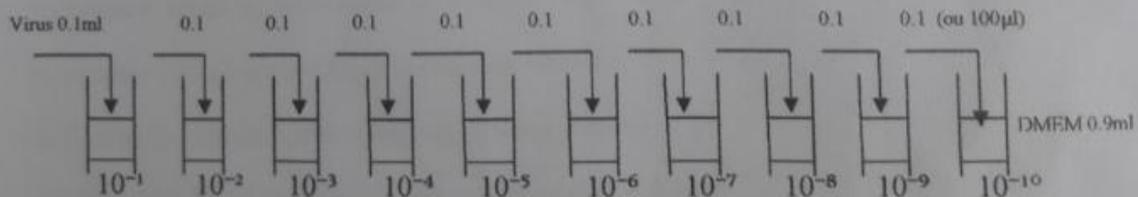
Titre final:
 $T = 10^{9,25}$ DICT₅₀ / ml

DICT₅₀ / dose

TITRAGE DU VIRUS DE LA CLAVELEE SUR MICROPLAQUES A 96 PUIITS

I TECHNIQUE

1. Choisir une boîte de cellules présentant un tapis confluent
2. Trypsiner et récupérer les cellules dans 5ml de milieu (Cf. Fiche N°9)
3. Procéder à la numération cellulaire de la suspension obtenue (Cf. Fiche N°10)
4. Préparer une suspension cellulaire à 100.000 c / ml dans du DMEM à 10% SVF
5. Sur une microplaque marquer 8 rangées verticales de 8 cupules, correspondants aux Dilutions du virus allant de 10^{-1} à 10^{-10}
6. Prévoir la dernière rangée verticale de 8 cupules pour les cellules témoins (non infectés)
7. Répartir 100 μ l de la suspension cellulaire dans toutes les cupules de la microplaque
8. Préparer une série de dilutions du virus à titrer, allant de 10^{-1} à 10^{-10} dans du DMEM
 - Répartir 0.9 ml de Milieu DMEM dans 10 tubes à congélation stériles
 - Verser 0.1 ml de la suspension virale à titrer dans le 1^{er} tube
 - Transvaser 0.1 ml du 1^{er} tube au 2^{ème}, du 2^{ème} au 3^{ème}... etc... (Cf. Schéma ci-dessous)



9. Répartir 100 μ l des dilutions de virus dans les cupules verticales correspondantes
10. Répartir 100 μ l de milieu à 10% SVF dans les cupules témoins
11. Fermer la plaque, et incuber à 37°C dans l'étuve à 5% CO₂

TITRAGE DU VIRUS DE LA CLAVELEE

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	c Témoin	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

1. Trypsiner une boîte de cellule présentant un tapis confluent
2. Faire une numération de la suspension obtenue
3. Préparer une suspension cellulaire à 100.000g/ml
4. Répartir 100µl de cette suspension dans tous les puits sauf la colonne n°11
5. Fermer la boîte, mettre à l'étuve pendant 48 heures
6. Après formation d'un tapis cellulaire, vider la boîte de son milieu
7. Ajouter 100µl du virus allant de la dilution 10^{-1} à 10^{-10} dans les cupules correspondantes
8. Ajouter 100 µl de milieu dans cupules témoins
9. Laisser le virus adsorber pendant 30min à l'étuve
10. Rajouter 100µl de milieu a toutes les cupules utilisées
11. Mettre à l'étuve à 37°C
12. Lecture quotidienne de la plaque pendant 7 jours
13. Noter l'évolution de l'ECP sur la feuille de lecture

RÉSUMÉ

La clavelée ou la variole ovine, est une maladie à déclaration obligatoire.

Afin de juguler les effets, l'état organise des campagnes nationales de prophylaxie et utilise un vaccin vivant atténué (Clavax®) produit par l'institut pasteur d'Alger, à partir de la souche vaccinale RM65 sur le support cellulaire RM.

L'objectif de mon travail est de faire adapter le poxvirus sur la lignée cellulaire BSR avec des passages d'adaptation successive pour étudier la susceptibilité des BSR au poxvirus, et d'établir la cinétique de rendement viral par la technique de titrage.

Les résultats montrent une viabilité du virus, permissivité des cellules avec un titre viral élevé.

Mots clés :

Clavax®, RM65, le support cellulaire RM, la lignée cellulaire BSR, adaptation, poxvirus, titrage.

Summary:

Sheep pox or sheep pox is a reportable disease.

In order to control the effects, the state organizes national campaigns for prophylaxis and uses a live attenuated vaccine (Clavax®) produced by the Pasteur Institute of Algiers, from the RM65 vaccine strain on the RM cell support.

The aim of my work is to adapt the poxvirus to the BSR cell line with successive adaptation passages to study the susceptibility of the BSRs to the poxvirus, and to establish the kinetics of viral yield by the titration technique.

The results show a viability of the virus, permissiveness of cells with a high viral titer.

Keywords:

Clavax®, RM65, RM cell carrier, BSR cell line, adaptation, poxvirus, titration.

ملخص

الجدري أو جدري الأغنام عبارة عن مرض خطير. للحد من اثاره تنظم الدولة حملات وطنية للوقاية منه باستخدام لقاح موهن (كالفاكس®) ذو فيروس معدل ومنتج عن زراعات خلايا الكلى للخروف وذلك على مستوى معهد باستور بالجزائر. الهدف من العمل هو تكييف سلالة اللقاح RM65 مع الخلايا الدائمة BSR، حيث أجريت ممرات متعاقبة من اجل دراسة قابلية الخلايا لهذا الفيروس وأيضا السلوك الحركي للفيروس خلال الممرات المتعاقبة من خلال تقنية المعايرة. النتائج المتحصل عليها تظهر انحلال الخلايا BSR مع فيروس الجدري وزيادة كبيرة للعائد الفيروسي. هذه النتائج تفتح عديد الاحتمالات من اجل إمكانية استخدام هذه الخلايا في انتاج لقاح ضد فيروس مرض الجدري.

الكلمات المفتاحية:

، الخلايا الدائمة BSR ، فيروس الجدري، معايرة، تكييف.RM. كالفاكس®، سلالة RM65، الخلايا الأولية