

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE - ALGER

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة - الجزائر

PROJET DE FIN D'ETUDES

EN VUE D'OBTENTION

DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE.

Contribution a l'évaluation de l'efficacité de la vaccination antirabique chez le chien

Présenté par : ARHAB Mohamed.

BELAMRI Nadjib.

Jury :

Président : Dr ZAOUANI M

Maitre assistant A ENSV

Promoteur : Pr BENMAHDI M.H

Professeur ENSV

Co- promotrice : Dr YAHIAOUI .F

Maitre assistante A

Examinatrice : Mme DJELLOUT B

Maitre assistante A

Examinatrice : Dr ABELHAMID Z

MADR

Année universitaire : 2013/2014.

Remerciements

Nous exprimons nos remerciements sincères et respectueux

A notre Promotrice & Co-promotrice

Le Professeur BEN-MAHDI et le Docteur YAHIAOUI pour nous avoir permis de réaliser notre étude , pour nous avoir conseillés, et encouragés tout au long de cette étude. Nous leurs exprimons notre profonde gratitude et reconnaissance.

Aux membres du jury

Le Docteur ZAOUANI, pour nous avoir honorés en acceptant la présidence de ce jury.

Madame DJELLOUT

Madame ABDELHAMID

Pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour toute l'attention qu'ils y auront portée

Nous tenons ainsi à remercier le technicien du laboratoire de microbiologie, Madame Siham et tous les gens de la chenil de AIN TAYA, ainsi que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents que je remercie pour leurs soutiens, leurs encouragements et pour toute la confiance qu'ils me portent.

A mon frère ADEL qui a toujours été là.

A Dr MAHDI

A Dr BOUHAMED

A mon binôme MOHAMED.

A mon promoteur Pr BENMAHDI

Au Dr YAHYAOUÏ qui a toujours fait preuve de patience, diligence et dévouement.

A tous mes camarades étudiants surtout ceux du GROUPE 02.

A tous mes amis en particulier SID ALI et AMIMAR.

A tous ceux que je n'ai pas cités.

NADJIB

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à

Mes chers parents, aucune dédicace ne saurait exprimer mon amour, mon affection, mon respect et la chance de vous avoir à mes cotés chaque jours que Dieu fait.

À mes chères sœurs NARIMENE et la petite NESRINE

A tous mes amis, mes camarades de l'ENSV ainsi que mon binôme : NADJIB

A Dr BOUHAMED

Au Pr BENMAHDI ainsi au Dr YAHYAOUUI qui a toujours fais preuve de patience, diligence et dévouement.

A tous ceux que j'aime et je n'ai pas cité.

MOHAMED

Liste des abréviations

CD4+ : cluster de différenciation 4

CD8+ : cluster de différenciation 8

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

ELISA : de l'anglais enzyme-linked immunosorbent assay

IL : Interleukine

LT : Les lymphocytes T, dont la lettre « T » provient du « Thymus »

NK: Natural Killer

PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns

PH : potentiel hydrogène

UV : ultraviolet

Liste des figures

Figure 1 : répartition géographique de la rage dans le monde.....	3
Figure 2 : cheminement du virus rabique dans l'organisme.....	6
Figure 3 : plan de distribution des sérums sur la micro plaque	29
Figure 4 : représentation des taux globaux de réussite d'échec un ans apres la primovaccination	33
Figure 5 : comparaison des taux de réussites et taux d'échecs obtenue sur le vaccin inactivé adjuvé (rabigen) versus vaccin inactivé inadjuvé (rabisyva).....	34

Liste des tableaux

Composition du kit	28
Tableau 1 : taux de réussite globale et taux d'échec global	33
Tableau 2 : taux de réussite et taux d'échec par la vaccination par les vaccin inactivés adjuvés et non adjuvés	34

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Partie 1 : partie bibliographique

Chapitre I : La rage

I.1) Historique de la rage	2
I.2) Définition et importance de la rage	3
I.3) Etiologie de la rage	4
I.4) Transmission de la rage	5
I.5) Pathogénie	5
I.6) Expression clinique	6
1) rage furieuse	7
2) rage paralytique ou muette	7
I.7) Diagnostic	7
I.7.1) Diagnostic clinique	7
I.7.2) Diagnostic de laboratoire	8
1) Diagnostic direct	8
a) Identification histologique de lésion cellulaire caractéristique.....	8
b) Epreuve immunofluorescence	8
c) Immunofluorescence direct	9
2) Diagnostic indirect	9
I.8) Prophylaxie	9
I.8.1) Prophylaxie sanitaire	10
I.8.1.1) pays indemnes	10
a) Rage canine	10
b) Rage des animaux sauvage	10
I.8.1.2) Pays infectés	10
a) Rage canine	10
I.8.2) Prophylaxie médicale	11
I.9) Législation de la rage en Algérie	12

Chapitre II : vaccin et vaccination

II.1) Définition	13
II.2) Historique de la vaccination	13
II.3) différent type de vaccins	14
II.3.1) Les vaccins vivants	14
II.3.2) Les vaccins recombinants	14
II.3.3) Vaccins a agents inertes	14
II.3.4) Vaccins a agents inactivés	14
a) Avantage	14
b) Inconvénients	15
II.4) Immunité et système immunitaire	15
II.4.1) Réponse immunitaire innée	16
II.4.2) Réponse immunitaire adaptative ou acquise	17
II.4.2.1) Réponse immunitaire a médiation cellulaire	17
II.4.2.2) Réponse immunitaire a médiation hormonale	17

II.5) optimisation de la réponse immunitaire adaptative	18
II.5.1) adjuvant	18
- adjuvants minéraux	19
- Emulsions huileuses	19
- Liposomes	19
- Nano et microparticules	19
- Saponines	19
- ISCOMS's	20
- dérivés de polysaccharides	20
II.6) Voies d'administration des vaccins	20
II.6.1) Injection sous-cutanée	20
II.6.2) Injection intramusculaire	20
II.6.3) Injection intradermique	20
II.6.4) administration par voie muqueuse	21
II.7) Influence de différents facteurs sur l'efficacité de la vaccination	21
II.7.1) Alimentation	21
II.7.2) Stress	22
II.7.3) Age	22
II.7.4) influences hormonales	23
II.7.5) Médicaments	23
II.7.6) Immunodépression	24
II.8) Evaluation de l'efficacité de la vaccination antirabique par la méthode Elisa.....	24

Partie 2 : partie expérimentale

I. Objectif de l'étude	26
II. Matériel et méthodes	27
II.1) population étudiée et recrutement des animaux	27
II.2) vaccins utilisés	27
II.3) vaccination et protocoles de prélèvement.....	27
II.3.1) protocole vaccinal	27
II.3.2) Recueil et conservation des échantillons sériques.....	27
II.4) Analyse sérologique	28
II.4.1) principe	28
II.4.2) composition du KIT	28
II.4.3) Appareillages et Matériels	29
II.4.4) Protocole opératoire	29
II.5) procédure de l'essai.....	30
III. Résultat et discussion	32
III.1) Résultats Globaux de la vaccination par les vaccins inactives rabigen et rabisyva	33
III.2) Etude comparative des taux de réussite et des taux d'échec de la vaccination obtenus avec les vaccins inactives adjuvé et non adjuvé	34
IV. Conclusion	37

Introduction

La rage est une zoonose virale à laquelle sont sensibles tous les Mammifères, elle est due à plusieurs virus du Genre *Lyssavirus* qui présentent un tropisme important pour les cellules nerveuses.

C'est une maladie cosmopolite qui sévit dans plus de 150 pays, dont l'Algérie, où elle sévit encore sous forme enzootique chez l'animal, une moyenne de 886 cas a été rapportée entre 2005 et 2010, le chien étant l'animal le plus atteint, il représente 50% des cas enregistré et est souvent à l'origine de la rage chez l'Homme.

La rage bénéficie d'un programme de lutte national axée principalement sur l'éradication des chiens errants et la vaccination des animaux domestiques.

L'efficacité de la vaccination conditionne le succès de la lutte contre la rage, par conséquent, le contrôle de la vaccination est un point à considérer avec intérêt.

Notre étude a porté sur le contrôle de l'immunité humorale suscitée par deux vaccins utilisés en Algérie, un vaccin inactivé adjuvé *Rabigen Virbac* et un vaccin inactivé non adjuvé *Rabisyva Syva*. Nous avons ainsi comparé la réponse des chiens à chacun des vaccins un an après la réalisation de l'acte vaccinal.

Notre travail s'articule sur deux parties :

La première est une synthèse bibliographique comportant deux chapitres principaux, le premier reprend en revue la rage et son importance, le second traite de la vaccination et de l'évaluation de la vaccination antirabique.

La deuxième expérimentale, dans laquelle nous décrivons les matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail, nous rapportons également les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

CHAPITRE I: LA RAGE

I.1. HISTORIQUE DE LA RAGE

La rage est une maladie connue depuis la plus haute antiquité comme une affection mortelle, mais les travaux scientifiques les plus importants portant sur cette maladie ne furent réalisés qu'au XIX^{ème} siècle.

C'est ainsi qu'en 1879, Galtier, professeur à l'Ecole Vétérinaire de Lyon, transmet la maladie au lapin par injection de salive de chien enragé et immunise des moutons par injection intraveineuse de virus rabique.

En 1881, Pasteur, Chamberland, Roux et Thuillier montrent la virulence du système nerveux et l'intérêt de l'inoculation intracérébrale; ils effectuent des passages en série du virus par inoculation intracérébrale au lapin et obtiennent un virus « fixe » qui, après « atténuation » par dessiccation, sera utilisé pour la vaccination antirabique de l'Homme, réalisée pour la première fois le 6 juillet 1885, sur un garçon de 9 ans, Joseph Meister, mordu par un chien enragé.

Ultérieurement, de nombreux travaux furent réalisés dans le domaine du diagnostic, du traitement, de l'épidémiologie, dans la connaissance de la structure du virus, de l'immunologie, de la pathogénie, etc (*Toma, 2006*).

I.2. DEFINITION ET IMPORTANCE DE LA RAGE

La rage est une maladie infectieuse, virulente, inoculable en général par morsure. Cette maladie commune à l'Homme et à la plupart des mammifères est due à un rhabdovirus neurotrope (*Toma. 2006*).

De façon schématique, on peut dire que la rage canine ne sévit plus dans les pays industrialisés, mais qu'elle demeure la forme épidémiologique essentielle en Afrique et en Asie.

L'Europe connaît une enzootie de rage sauvage entretenue par les renards ; l'Amérique du Nord, également touchée, présente des vecteurs sauvages plus variés tels que le renard, la mouffette ...

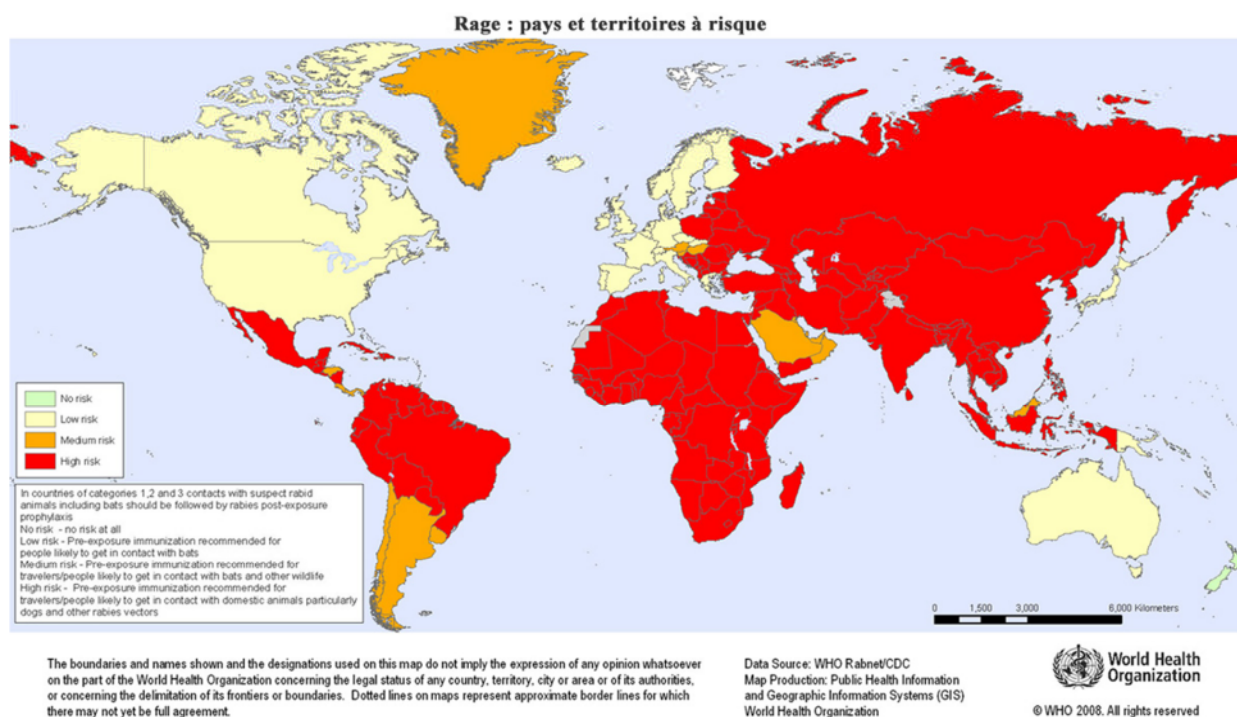


Figure 1 : Répartition géographique de la rage dans le monde (OMS, 2013)

L'importance de la rage est, avant tout, médicale, en effet, tous les cas de rage humaine sont d'origine animale. Par ailleurs, lorsqu'elle est cliniquement déclarée chez l'Homme, l'évolution vers la mort est inéluctable.

Chaque année, plus de 55 000 personnes meurent de rage dans plus de 150 pays. Par ailleurs, plus d'un million de personnes sont mordues par des animaux enrégés ou suspects de rage et subissent le « traitement » antirabique; les coûts élevés,

ainsi engagés dans la lutte contre la rage matérialisent l'importance non négligeable de cette maladie sur le plan économique (**OMS, 2013**).

En Algérie, la rage sévit à l'état enzootique, une moyenne de 800 cas animaux est relevée annuellement, l'espèce canine est la plus affectée, en effet, elle constitue plus de 50% des cas (**DSV, 2013**).

I.3. ETIOLOGIE DE LA RAGE

Le virus rabique appartient à la famille des *Rhabdoviridae* qui fait partie de l'ordre des *Mononégavirales*. Les *Lyssavirus* sont des virus à acide ribonucléique (ARN) négatif monocaténaire non segmenté.

Leur aspect au microscope électronique est classiquement comparé à celui d'une « balle de fusil ». Leur longueur moyenne est de 100 à 300 nm et leur diamètre de 75 nm. Les variations de taille sont dues aux différentes souches et à la présence de particules défectives interférentes (**Rotivel & Goudal, 2007**).

Ce sont des virus enveloppés et par conséquent des virus fragiles qui sont détruits par des agents physiques (chaleur, lumière, UV...), mais aussi par des agents chimiques (les solutions savonneuses, solvants organiques, l'eau de Javel, les pH extrêmes...); ils peuvent toutefois se conserver par le froid (– 80°C) et la lyophilisation. Ils résistent en outre à la putréfaction (**Fleury, 2009**).

I.4. TRANSMISSION DE LA RAGE

La source virulente principale étant la salive et la résistance du virus dans le milieu extérieur étant limitée, la contamination est essentiellement directe et le mode privilégié de transmission du virus rabique est la morsure.

Chez les carnivores, la contamination est améliorée par la présence de hyaluronidase dans la salive qui favorise la diffusion du virus.

Outre le titre viral au moment de la morsure, le risque de contamination dépend également :

- de la protection locale : épaisseur des vêtements, animal à fourrure plus ou moins abondante... ;
- de la zone mordue, notamment de son innervation, de sa proximité des centres nerveux (truffe ou membre) ;
- des caractéristiques de la morsure : le chat provoque généralement des plaies plus délabrantes que le chien.

Les deux autres modes principaux de contamination sont la griffade et le léchage.

Bien que relevées régulièrement dans la littérature, les autres modalités de transmission virale sont rares dans les conditions naturelles. Citons l'inhalation d'un aérosol viral (rage des chiroptères), l'ingestion de viande crue provenant d'un animal enragé (la cuisson détruit le virus) et la transmission *in utero* (**Eloit, 1998**).

I.5. PATHOGENIE

Le virus se multiplie à son point d'inoculation dans les cellules du muscle favorisant ainsi l'infection ultérieure des terminaisons nerveuses. Le neurone est la cellule de l'organisme la plus sensible au virus de la rage (**Toma, 2006**)

Suite à la contamination, le virus gagne les tissus nerveux périphériques et se propage à la moelle épinière et au système nerveux central de manière centripète via les nerfs périphériques.

Après avoir gagné le cerveau, le virus se dissémine à l'ensemble des tissus de manière centrifuge en passant toujours par les nerfs périphériques (**Lepretre, 2008**).

Il faut signaler le cas des **glandes salivaires** où on observe une répllication virale importante. La production de particules virales dans les glandes salivaires permettra à l'animal infecté de transmettre la rage par morsure (*Toma. 2006*).

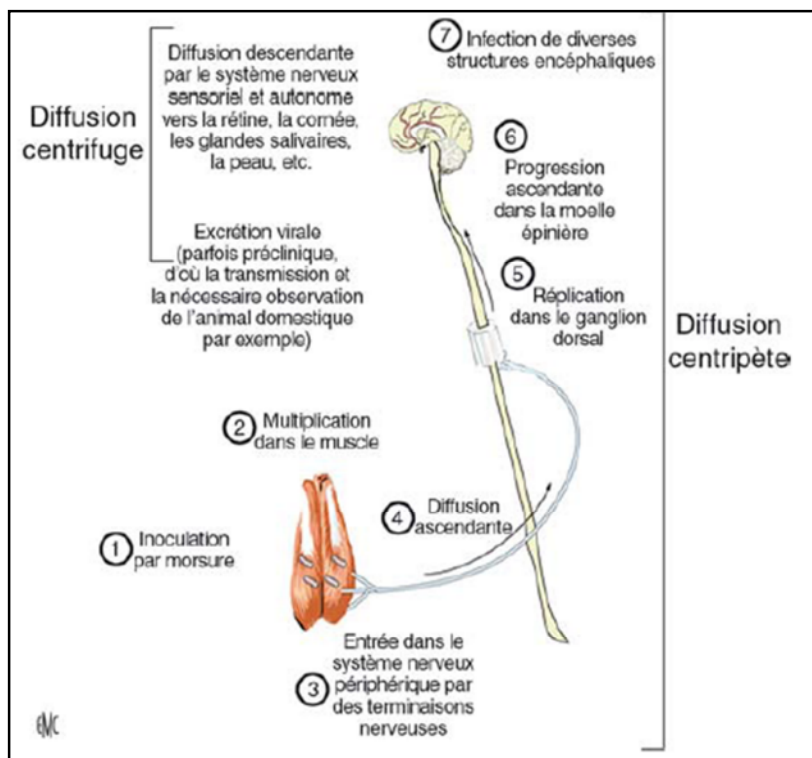


Figure 2 : Cheminement du virus rabique dans l'organisme
(*Ribadeau et al, 2010*)

I.6. EXPRESSIONS CLINIQUES

L'incubation, parfaitement silencieuse, est de durée variable selon la souche et la quantité de virus contaminant, le point d'inoculation et notamment sa proximité des centres nerveux. Le tableau clinique est dominé par des troubles nerveux évoluant dans la très grande majorité des cas vers la mort en quelques jours (*Eloit, 1998*).

Les ouvrages et les monographies consacrés à la rage distinguent classiquement une forme « furieuse », caractérisée par une excitation extrême de l'animal, et une forme « mue », dominée par une paralysie progressive (*Eloit ; Haddad, 2012*).

1. Rage furieuse

Les animaux peuvent être anxieux, très excitable et/ou agressifs, avec des phases intermittentes de dépression. Avec la disparition de leur prudence et crainte naturelle vis-à-vis des autres animaux et de l'homme, les animaux touchés par cette forme de rage peuvent faire preuve d'un changement soudain de comportement et attaquer sans avoir été provoqués. Lorsque la maladie évolue, on observe fréquemment un affaiblissement musculaire, des troubles de la coordination et des convulsions. La mort résulte d'une paralysie progressive.

2. Rage paralytique ou muette

Les animaux atteints de cette forme de rage peuvent être déprimés ou inhabituellement dociles. Ils présentent souvent une paralysie, généralement de la face, de la gorge et du cou, ce qui provoque des expressions faciales anormales, une hyper-salivation et une incapacité à avaler. La paralysie peut toucher le corps, en commençant par les pattes arrières. Elle s'étend rapidement à l'ensemble du corps, en évoluant vers le coma et la mort.

I.7. DIAGNOSTIC

I.7.1. DIAGNOSTIC CLINIQUE

Le diagnostic de la rage sur le terrain est très difficile, étant donné le polymorphisme clinique de la maladie

Chez l'animal, il n'existe pratiquement **pas d'élément clinique critère de rage** : « tout est rage et rien n'est rage ». Seule, **l'évolution rapidement mortelle**, avec paralysie progressive, possède une très grande valeur diagnostique : c'est pourquoi, il importe de suivre l'évolution de la maladie en entier et de ne pas sacrifier un animal suspect de rage (sauf dans une circonstance, à savoir lorsque son maintien en vie entraîne des risques incontrôlables de contamination de personnes). En effet, sacrifier un animal cliniquement suspect de rage équivaut à supprimer le meilleur moyen diagnostique d'infirmier la suspicion (par constatation de la guérison ou de la survie de l'animal) (*Toma. 2006*).

I.7.2. DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

L'examen clinique ne peut conduire qu'à une suspicion de rage parce que les symptômes de la maladie ne sont pas caractéristiques et peuvent varier grandement d'un animal à l'autre. Le seul moyen d'établir un diagnostic fiable de rage est d'identifier le virus ou l'un de ses composants spécifiques au moyen d'épreuves de laboratoire (*Manuel terrestre de l'OIE, 2005*).

1- DIAGNOSTIC DIRECT

a. Identification histologique de lésions cellulaires caractéristiques

Les corps de Negri sont des agrégats de protéines virales, mais les techniques de coloration traditionnelles ne mettent en évidence qu'une affinité de ces structures pour des colorants acidophiles. Les épreuves immunohistochimiques sont les seules épreuves histologiques spécifiques de la rage.

Un étalement de tissu non fixé peut être coloré selon la technique de Seller. La réponse est alors obtenue en 1 heure. En général, les épreuves histologiques, comme la coloration de Mann, sont effectuées sur des tissus fixés après une étape d'inclusion en paraffine, les résultats sont alors obtenus en 3 jours. Ces techniques ont l'avantage d'être bon marché et de ne pas nécessiter de froid pour la conservation du matériel fixé. Quelle que soit la technique de coloration utilisée, une lame positive montre des inclusions intra-cytoplasmiques acidophiles (*Manuel terrestre de l'OIE, 2005*).

b. Épreuve d'immunofluorescence

L'épreuve la plus utilisée pour le diagnostic de rage est l'IF, elle est recommandée à la fois par l'OMS et l'OIE. Cette épreuve peut être utilisée directement sur un étalement, elle peut aussi être utilisée pour confirmer la présence de l'antigène rabique dans des cellules ou le cerveau de souris inoculées pour diagnostic. Sur des prélèvements frais, l'IF donne des résultats fiables dans plus de 95 à 99 % des cas. La sensibilité de l'IF dépend de l'échantillon (de son degré d'autolyse et de la manière dont il a été prélevé), du type de lyssavirus et de la compétence de l'équipe de diagnostic (*Manuel terrestre de l'OIE 2005*). (*BARRAT J. & AUBERT, 1995*)(*AUBERT, 1982*)

c. Immunofluorescence direct

Des calques de corne d'Ammon sont soumis à l'action d'un conjugué fluorescent anti-nucléocapside du virus rabique (les témoins nécessaires sont réalisés pour vérifier le bon fonctionnement de la technique et la spécificité de la réponse).

Les amas d'antigène du virus rabique sont ensuite recherchés au microscope à fluorescence. Ils apparaissent sous forme de points plus ou moins gros colorés en vert brillant sur fond noir, avec un liseré plus lumineux.

Cette réaction possède plusieurs avantages : elle est rapide (la réponse peut être fournie dans la journée), moins onéreuse que les autres techniques et elle fournit d'excellents résultats (*Toma, 2006*)

2. DIAGNOSTIC INDIRECT

Différentes techniques sérologiques sont disponibles pour la recherche des anticorps antirabiques: séro-neutralisation sur souris ou en culture cellulaire, immunofluorescence indirecte, ELISA , FAVN, RFFIT.

Ces techniques ne sont guère utilisées pour le diagnostic mais plutôt pour le contrôle de l'immunité post-vaccinale (*Toma. 2006 ; Manuel terrestre de l'OIE 2005*).

I.8. PROPHYLAXIE

La prophylaxie de la rage varie selon le statut épidémiologique du pays vis-à-vis de la maladie ; mais aussi selon qu'il s'agisse d'une rage urbaine (animaux domestiques) ou d'une rage selvatique (animaux sauvages) (*Blancou, 1997*).

En général, la stratégie de lutte est basée sur une prophylaxie médico-sanitaire associant une prophylaxie sanitaire (réduction de la population sauvage vectrice) et une prophylaxie médicale par vaccination préventive.

I.8.1. PROPHYLAXIE SANITAIRE

La prophylaxie sanitaire correspond à une série de précautions ou d'actions visant à éliminer le réservoir responsable de la propagation de la maladie.

Les mesures de prophylaxie sanitaire appliquées diffèrent d'un pays à un autre selon qu'il soit indemne ou infecté:

I.8.1.1 Pays indemnes

a. Rage canine

Le principe est d'empêcher l'importation d'un animal en incubation de rage.

Les mesures défensives peuvent consister, selon le niveau de protection désiré :

- En une **interdiction** pure et simple d'importation (ex. : Australie, Nouvelle-Zélande...),
- En une **mise en quarantaine** prolongée (ex.: Grande-Bretagne: 6 mois pour les carnivores domestiques provenant de pays d'enzootie rabique, avec vaccination obligatoire au début de la quarantaine ; actuellement, vaccination avec contrôle sérologique)
- En un **certificat sanitaire** attestant que l'animal est en bonne santé et qu'il provient d'un pays indemne de rage (*Toma, 2006*)

b- Rage des animaux sauvages

Le principe consiste à diminuer fortement la densité de population de l'espèce animale vectrice potentielle dans une bande de terrain assez large le long de la frontière avec le pays où la maladie sévit (*Toma, 2006*).

I.8.1.2 Pays infectés

a. Rage canine

Pour empêcher la transmission du virus rabique par le chien, il importe de limiter les possibilités de rencontre entre animaux par conséquent:

- **Capture et destruction des chiens et chats errants**

Mesures vis-à-vis des différentes catégories d'animaux :

- **Animal sûrement enragé** (l'attention est attirée sur la difficulté d'être sûr qu'un animal est enragé) : Sacrifice immédiat.
- **Animal suspect de rage : Mise en observation** pour suivre l'évolution clinique ; si celle-ci risquait d'être la cause de contaminations humaines (animal très dangereux, échappé...) : sacrifice.
- **Animal contaminé** (c'est-à-dire ayant été mordu par, ou ayant eu un contact étroit avec un animal enragé) : **Sacrifice**; mais si l'animal contaminé était en état d'immunité antirabique au moment de la morsure et si l'on peut contrôler correctement ses mouvements au cours des mois suivants, on peut envisager un rappel de vaccination et une conservation de l'animal.
- **Animal mordeur** : Tout animal mordeur doit être **mis en observation** afin de vérifier l'évolution de son état de santé (possibilité ou non d'excrétion virulente salivaire au moment de la morsure) ; l'O.M.S. prévoit une surveillance pendant 15 jours ; En France, : 15 jours (cf. législation sanitaire).

La mise en œuvre de l'ensemble de ces mesures fournit d'excellents résultats dans tous les pays possédant un système sanitaire bien structuré. Elles ont permis de faire disparaître la rage canine de la quasi totalité des pays d'Europe, des Etats-Unis, du Canada... En revanche, leur application se heurte à de très grandes difficultés techniques et financières dans différents pays d'Afrique et d'Asie et au nombre très élevé de chiens errants (*Toma. 2006*).

I.8.2. PROPHYLAXIE MEDICALE

Elle consiste en la vaccination des populations animales domestiques et sauvages.

La vaccination des animaux sauvages n'est entreprise que dans certaines parties du monde; en Europe notamment qui est confronté à la rage vulpine, la vaccination se fait par voie orale.

Concernant les animaux domestiques, ceux-ci sont vaccinés à partir de 3 mois pour les chiens et les chats, et de 6 mois pour les bovins, ovins, caprins, équidés. Un rappel annuel est obligatoire.

Les différents vaccins antirabiques utilisés dans la prophylaxie médicale de la rage animale seront détaillés dans le chapitre suivant.

Chez l'homme, la vaccination antirabique est indiquée dans deux situations:

Intervention avant exposition: il s'agit de la vaccination préventive, elle est proposée aux personnes ayant un risque élevé d'exposition à la rage (les universitaires chercheurs et personnel des laboratoires de référence de la rage, les chiroptérologues, les vétérinaires, les animaliers, les gardes forestiers...) (*Aubry & Rotivel, 2001*) .

Intervention post exposition : vaccination thérapeutique

I.9. LEGISLATION DE LA RAGE EN ALGERIE

La rage est une maladie à déclaration obligatoire chez toutes les espèces. Dans le cadre de la lutte contre les zoonoses, un comité national et des comités de wilayas ont été institués dans un cadre intersectoriel par l'arrêté interministériel du 1 septembre 1984, pour une prise en charge effective et une maîtrise cohérente des maladies transmissibles à l'homme par l'animal (*JORA, 1984*).

Un programme pluriannuel de lutte contre cette zoonose a été mis en place depuis 1996. Ce dernier est axé principalement sur la réduction de la population animale errante et la vaccination obligatoire des carnivores domestiques. Depuis 2003, cette vaccination a été étendue à l'espèce bovine (*JORA, 1996, 2003*).

Chapitre II: vaccin & vaccination

II.1 Définitions

La vaccination est un acte médical préventif, de précaution ou de nécessité, visant à induire une immunité protectrice et une mémoire immunitaire chez un sujet contre une ou plusieurs maladies (*Desmettre & Chappuis, 1990*)

Un vaccin est une préparation antigénique qui a pour but d'induire chez la personne ou l'animal qu'on vaccine, une réponse immunitaire spécifique d'un agent pathogène capable de le protéger contre l'infection naturelle ou d'en atténuer les conséquences.

II.2 Historique de la vaccination

La première approche de la vaccination a eu lieu en Chine par la découverte de la variolisation, permettant ainsi la protection des individus contre la variole. Puis en 1776, E. Jenner découvre le concept de la vaccination en améliorant la variolisation par l'utilisation de lésions bovines pour protéger l'homme.

Louis Pasteur précise alors ce concept en atténuant différents micro- organismes dont le virus rabique en 1885, assurant ainsi la protection de l'homme contre cette zoonose. En 1923, G. Ramon découvre les anatoxines ainsi que la possibilité d'utiliser des adjuvants pour améliorer la réaction lors de la vaccination. Enfin, en 1924 Salk met au point le premier vaccin inactivé contre la poliomyélite (*Lepretre, 2008*).

Au cours des années, la technique s'est ainsi améliorée, notamment par la découverte d'épitopes ou déterminants antigéniques dits « protecteurs » très immunogènes, assurant l'efficacité de la vaccination et permettant le développement de nouveaux vaccins, basés sur ces épitopes. Par ailleurs, la vaccination s'est progressivement étendue des virus, aux bactéries puis aux parasites (*Lepretre, 2008*).

II.3 Différent type de vaccins

II.3.1 Les vaccins vivants

Ce type de vaccin contient des microorganismes vivants conservant leurs propriétés d'antigénicité et d'immunogénicité mais non pathogènes pour l'animal vacciné (**Gorha, 1986**).

II.3.2 Les vaccins recombinants

Il est désormais possible de créer de nouvelles souches de micro-organismes rendues totalement inoffensives par voie génétique. Il s'agit d'inactiver précisément, ou d'éliminer, - quant ils sont connus- les gènes responsables de leur pouvoir pathogène ou gènes de **virulence**. Les bactéries ou virus ainsi atténués ne sont finalement pas très différents des vaccins vivants classiquement atténués : on obtient des micro-organismes inoffensifs mais identiques en apparence, donc pour le système immunitaire, aux souches naturelles.

II.3.3 Vaccins à agents inertes

L'agent contenu dans ce type de vaccin est par définition, incapable de se multiplier chez L'hôte (**Gorha, 1986**).

II.3.4 Vaccins à agents inactivés

L'inactivation de l'agent infectieux par différentes méthodes physiques ou chimiques (réticulation par le formaldéhyde, alkylolation par la bêta-propiolactone, etc....) permet d'empêcher sa réplication sans altérer les propriétés d'immunogénicité de celui-ci. L'association d'un adjuvant est cependant indispensable afin d'améliorer la réaction immunitaire induite en augmentant la rétention et l'activité de l'antigène au sein de l'hôte (**Gorha, 1986**).

a. Avantages

L'utilisation de vaccins à agents inactivés évite tout risque de virulence résiduelle et de réversion de virulence permettant une utilisation sûre en cours de gestation ou pour la vaccination de sujets à risque tels que les nouveau-nés privés de colostrum ou les immunodéprimés (**Gorha, 1986**).

b. Inconvénient

De manière générale, l'absence de réplication chez l'hôte oblige à pratiquer deux injections de primo-vaccination à trois à six semaines d'intervalles en vue d'une protection efficace pendant six mois à un an selon les vaccins. Cependant, certaines spécialités ne nécessitent qu'une seule injection de primo-vaccination. Cette protection est donc plus courte que celle obtenue à l'aide de vaccins à agents vivants et ne concerne que l'immunité à médiation humorale. En effet, l'immunité à médiation cellulaire n'est que peu stimulée par ce type de vaccins à haute masse antigénique

Enfin, la présence obligatoire d'adjuvants induit une toxicité à l'origine éventuellement d'effets secondaires locaux et systémiques ainsi que de réactions d'hypersensibilité.

II.4 Immunité et système immunitaire

L'immunité se définit comme la capacité d'un organisme à répondre à des agressions par des agents pathogènes, assurant ainsi un état de résistance à une infection. Plusieurs systèmes de défense, plus ou moins spécifiques, participent alors au maintien de l'immunité et constituent le système immunitaire. Celui-ci est représenté par deux éléments complémentaires :

- L'immunité innée est constituée de différents mécanismes non spécifiques permettant de lutter efficacement contre la majorité des agents pathogènes :
 - les barrières physiques de l'organisme forment le premier mécanisme de défense de l'organisme. Ainsi, la peau, la flore normale retrouvée au niveau de la peau et des muqueuses, ainsi que des phénomènes mécaniques permettant l'élimination des agents pathogènes (toux, éternuement, et mucus pour le tractus respiratoire ; vomissement et diarrhée pour le tractus gastro-intestinal ; flux urinaire pour le tractus urinaire) assurent un rôle majeur au sein du système immunitaire,
 - la réponse immunitaire innée se met en place de manière rapide, constante et immédiate face à un agent pathogène. En effet, la réaction inflammatoire aiguë provoquée par l'afflux de cellules et d'enzymes sur le site d'infection aboutit à une destruction de l'agent. Cependant, aucune mémoire immunitaire n'est créée lors de cette réaction,

Enfin, l'immunité adaptative ou acquise est à l'origine d'une réponse immunitaire spécifique, plus efficace, notamment lors d'un contact répété avec un agent pathogène

puisqu'elle permet la mise en place d'une mémoire immunitaire. Ainsi, la réponse immunitaire à médiation humorale et la réponse immunitaire à médiation cellulaire sont respectivement dirigées contre les agents pathogènes extracellulaires et intracellulaires. La vaccination vise alors à stimuler ces deux types de réponses immunitaires afin de permettre la mise en place d'une mémoire immunitaire (*Lepretre, 2008*).

II.4.1 Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée est liée à des mécanismes immunitaires non spécifiques mettant en jeu des facteurs humoraux (système du complément et certaines cytokines) et cellulaires (cellules Natural killer ou NK, granulocytes, macrophages, monocytes, cellules dendritiques). Elle est caractérisée par sa rapidité de mise en place mais aussi par sa faible durée et sa constance à chaque réinfection

Enfin, les protéines plasmatiques constituant le système du complément peuvent se lier directement à un agent pathogène et ainsi être activées (ce mécanisme est appelé la voie alternative d'activation du complément)

La réaction immunitaire innée permet une stimulation de la réaction immunitaire adaptative

- La réaction immunitaire innée permet l'activation des cellules présentatrices d'antigène professionnelles (ou CPA : monocytes, macrophages, cellules dendritiques, granulocytes). Présentes à l'état immature sur les sites d'inflammation, ces cellules phagocytent l'agent pathogène ou les débris cellulaires de cellules infectées détruites et migrent ensuite vers les tissus lymphoïdes. Au cours de leur migration, s'effectue une maturation de ces cellules qui consiste en l'expression de molécules du CMH, de molécules d'adhésion cellulaire et de molécules de costimulation au niveau de la membrane cellulaire. Ces molécules, associées à l'antigène permettent l'activation des lymphocytes T participant à la réaction immunitaire adaptative au niveau des tissus lymphoïdes,

Le système du complément, lié à un antigène permet l'activation des lymphocytes B au sein des tissus lymphoïdes

Ainsi, la réaction immunitaire non spécifique participe à la mise en place d'une réaction immunitaire adaptative en permettant la stimulation du système immunitaire acquis (*Saalmüller, 2006*).

II.4.2 Réponse immunitaire adaptative ou acquise

Cette réaction immunitaire est spécifique d'un type antigénique et permet l'induction d'une mémoire immunitaire. Sa mise en place requiert plus de temps que dans le cas de la réponse immunitaire innée mais sa durée est plus importante. La vaccination va donc avoir pour but de stimuler ce type d'immunité (*Saalmüller, 2006*).

II.4.2.1 Réponse immunitaire à médiation cellulaire

L'activation des lymphocytes T se fait grâce aux CPA professionnelles ayant participé à la réaction immunitaire innée ou grâce aux cellules infectées par l'agent pathogène dans les organes lymphoïdes périphériques (rate, nœuds lymphatiques, tissu lymphoïde muqueux) (*Lepretre, 2008*).

Les lymphocytes de type CD4⁺ reconnaissent les antigènes protéiques spécifiques présentés en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) présent sur la membrane cellulaire des CPA professionnelles.

Enfin, les lymphocytes T de type CD8⁺ peuvent reconnaître un antigène protéique spécifique présenté par voie « endogène » en association avec le CMH I sur les cellules infectées par l'agent pathogène majoritairement, ou grâce à certains adjuvants.

II.4.2.2 Réponse immunitaire à médiation humorale

La reconnaissance d'un antigène par les lymphocytes B peut s'effectuer de différentes manières au sein des tissus lymphoïdes périphériques :

- Dans le cas d'un antigène dit « thymo-dépendant », le lymphocyte B reconnaît directement l'antigène, le phagocyte, et par la voie de présentation « exogène », présente un fragment peptidique antigénique, en association avec les molécules du CMH II en surface cellulaire. Ce complexe est ainsi reconnu par les lymphocytes T de type CD4⁺ qui sécrètent alors des cytokines (IL-2, IL-4, IL-5) à l'origine de l'activation des lymphocytes B,
- Dans le cas d'un antigène dit « thymo-indépendant », de nature non protéique, l'activation des lymphocytes B se fait par la reconnaissance directe de l'antigène. Cette activation directe ne permet alors que la production d'anticorps de faible affinité et n'induit pas de stimulation des LT helper, d'où l'absence de formation de cellules mémoire

L'activation des lymphocytes B est suivie d'une phase d'expansion clonale et de

différenciation aboutissant à la formation de plasmocytes producteurs d'anticorps spécifiques de l'antigène reconnu et de lymphocytes B de type mémoire dans le cas d'un antigène thymo-dépendant. Les anticorps ainsi produits circulent dans le sang et peuvent rejoindre les tissus où ils participent à la destruction de l'agent pathogène selon différents mécanismes :

- Les anticorps peuvent neutraliser l'agent pathogène ou sa toxine en se liant spécifiquement aux antigènes,
- Les anticorps peuvent « marquer » l'agent pathogène en se liant aux antigènes de surface (opsonisation) et ainsi favoriser la destruction par les phagocytes,

Liés aux antigènes de surface, les anticorps peuvent induire l'activation du complément. Ce mécanisme aboutit à la lyse ou à la phagocytose du complexe ainsi formé l'agent pathogène (**Revillard, 2001**).

II.5 Optimisation de la réponse immunitaire adaptative

II.5.1 Adjuvant

L'adjuvant a été défini en 1924 par Ramon comme étant une « substance utilisée en combinaison avec un antigène spécifique qui produit une réaction immunitaire plus importante que l'antigène seul ».

Ainsi, l'adjuvant est utilisé pour augmenter l'immunogénicité d'un antigène, augmenter la durée et la vitesse de la réaction immunitaire, moduler la réponse immunitaire à médiation humorale ou cellulaire, favoriser l'induction d'une immunité muqueuse, augmenter la réaction immunitaire chez des individus immatures ou immunodéprimés, permettre de réduire la dose d'antigène nécessaire ou diminuer la compétition antigénique au sein des vaccins multivalents (**Roth, 2003**).

Ces propriétés peuvent alors être obtenues par différents mécanismes d'actions :

- Augmentation de la présentation de l'antigène en favorisant sa capture par les CPA, en augmentant l'expression des molécules de costimulation ou du CMH à la surface des CPA ou en améliorant la migration des CPA vers les nœuds lymphatiques. Ainsi certains antigènes forment un dépôt avec l'antigène et ne libèrent ce dernier que de manière très progressive, ou peuvent saturer les cellules de Kupffer au niveau du foie afin de limiter l'élimination de l'antigène par cet organe. D'autres adjuvants imitent les PAMP ou les débris cellulaires

libérés par les cellules infectées pour stimuler plus efficacement les CPA,

- Immunomodulation : certains adjuvants activent les cellules dendritiques et les macrophages, permettant ainsi une augmentation de la production de certaines cytokines. Celles-ci sont alors à l'origine d'une stimulation des LT helper et orientent la réponse immunitaire

Plusieurs types d'adjuvants ont ainsi été développés et agissent donc de différentes manières afin d'améliorer la réponse immunitaire, nous en citons quelques uns :

- **Adjuvants minéraux**

Les adjuvants minéraux sont en général des sels d'aluminium (hydroxyde d'aluminium, phosphate d'aluminium, sulfate de potassium d'aluminium) sous forme de suspension colloïdale insoluble sur laquelle l'antigène est adsorbé (*SCHIJNS, 1997*).

- **Emulsions huileuses**

Formées à partir du mélange de deux liquides non miscibles et chimiquement non réactifs, stabilisé par l'ajout de surfactant (*Roth, 2003*).

- **Liposomes**

Ces sphères microscopiques sont formées de phospholipides et de molécules de cholestérol, imitant ainsi la membrane cellulaire et contenant l'antigène incorporé dans la lumière ou dans la membrane formée (*Roth, 2003*).

- **Nano- et microparticules**

Ces particules solides sont obtenues à partir de polymères biodégradables et forment un dépôt qui libère l'antigène pendant plusieurs mois. Des mélanges de microparticules libérant plus ou moins rapidement l'antigène peuvent donc induire une réponse immunitaire primaire et secondaire en une seule administration (*Roth, 2003*).

- **Saponines**

Les saponines sont des glycosides triterpènes issus des plantes (*Quillaria Saponaria*) dont les activités toxiques et adjuvantes peuvent être séparées par fractionnement moléculaire. Immunomodulateurs, ils induisent une réponse à médiation humorale ou cellulaire (*Roth, 2003*).

- **ISCOM's**

Les ISCOM's (immune stimulating complex) sont formés à partir de phosphatidylcholine, de cholestérol et de saponine et ont une action immunomodulatrice permettant de stimuler la réponse immunitaire à médiation cellulaire majoritairement (*SCHIJNS, 1997*).

- **Dérivés de polysaccharides**

Les dérivés de polysaccharides agissent en saturant les cellules de Kupffer situées au niveau du foie, permettant ainsi de ralentir la dégradation de l'antigène par ce même organe (*Roth, 2003*).

II.6 Voies d'administration des vaccins

II.6.1 Injection sous-cutanée

La région dorsale du cou présente un excès de peau permettant de réaliser facilement les injections sous-cutanées. Cependant, l'absorption y est assez faible du fait de la présence de tissu adipeux et de la moindre vascularisation en comparaison au muscle (*Pastoret, 1997*).

II.6.2 Injection intramusculaire

Le muscle constitue un site très vascularisé permettant une exposition efficace de l'antigène au système immunitaire. Néanmoins, ce type d'injection s'avère plus complexe car il est nécessaire de bien choisir le site d'injection afin d'éviter une injection dans le tissu interstitiel contenant beaucoup de tissu adipeux (*Pastoret, 1997*).

II.6.3 Injection intradermique

Douloureuse et très technique, ce type d'injection permet toutefois une excellente exposition de l'antigène et nécessite donc que de faibles quantités d'antigènes (*Pastoret, 1997*).

II.6.4 Administration par voie muqueuse

Cette voie est utilisée pour certains vaccins à agents vivants modifiés en utilisant la voie naturelle d'entrée du virus. En effet, elle induit une réponse immunitaire muqueuse (sécrétion locale d'IgA) et systémique. Par ailleurs, dans le cas des jeunes et des nouveau-nés, la neutralisation de l'antigène vaccinal par les anticorps maternels est évitée par ce type d'administration (*Pastoret, 1997*).

Cependant, cette voie d'administration ne permet pas l'obtention d'une mémoire immunitaire et s'avère totalement inefficace pour des vaccins à agents inactivés ou particuliers, ou contre des virus se propageant vers des tissus cibles via les systèmes lymphatiques et circulatoires. La combinaison d'une vaccination par voie parentérale puis par voie muqueuse permet alors à une stimulation complète du système immunitaire (*Pastoret, 1997*).

L'efficacité de plusieurs vaccins de ce type contre les maladies virales des carnivores domestiques a pu être démontrée. Cependant certains ont été abandonnés du fait de l'apparition de signes cliniques dans les heures suivant l'administration ou ont été réservés à la faune sauvage (vaccin à agent vivant modifié contre la Rage présentant un risque de réversion de virulence et utilisé dans les seuls cas où l'administration parentérale d'un vaccin à agent inactivé est impossible).

II.7 Influence de différents facteurs sur l'efficacité de la vaccination

L'efficacité du vaccin peut être compromise par un mauvais stockage s'il s'agit de vaccin à agent vivant, par l'utilisation excessive d'alcool au point d'injection, par l'emploi de produits chimiques pour stériliser la seringue, mais aussi par plusieurs facteurs dont:

II.7.1 Alimentation

La malnutrition entraîne des dysfonctionnements du système immunitaire. Ainsi, des apports insuffisants d'un point de vue protéique et calorique diminuent les capacités de phagocytose, de production d'anticorps mais aussi la réaction immunitaire à médiation cellulaire.

Par ailleurs, les apports en vitamines et minéraux conditionnent aussi la réponse de l'animal à la vaccination. De fait, des études ont montré que des déficits sévères en acide pantothenique, en acide folique et en pyridoxine diminuent les capacités de production

d'anticorps suite à certaines injections vaccinales. De plus, des apports insuffisants en vitamine E et sélénium créent une immunodépression et sont donc responsables d'une baisse de la réponse immunitaire en cas de vaccination

Enfin, les effets de caroténoïdes tels que la lutéine, améliorent la réponse immunitaire de façon globale (composantes humorale et cellulaire) et auraient donc leur importance dans la composition de la ration alimentaire

En pratique, on constate que les déséquilibres alimentaires sont souvent multiples et les effets observés sur la réponse immunitaire sont donc sûrement multifactoriels. Une alimentation équilibrée et apportée en quantité suffisante est ainsi indispensable à l'efficacité de la vaccination (*Lepretre, 2008*).

II.7.2 Stress

La manipulation excessive de l'animal, l'exposition à des températures extrêmes, une anesthésie, une intervention chirurgicale, un parasitisme important, un traumatisme ou des phénomènes néoplasiques peuvent engendrer un stress responsable d'une dégradation de la réponse immunitaire (*Lepretre, 2008*).

II.7.3 Age

A la naissance, le nouveau-né possède un système immunitaire immunocompétent mais immature. En effet, l'interaction entre cellules présentatrices d'antigènes et lymphocytes T est imparfaite, certaines cytokines ne peuvent pas encore être sécrétées, d'où une réponse immunitaire à médiation cellulaire peu efficace. Ceci se traduit donc par une sensibilité importante aux infections. Il est donc recommandé de protéger le nouveau né du mieux possible, en compensant sa sensibilité par un transfert passif de l'immunité via le colostrum.

Les anticorps maternels protecteurs sont, par la suite, dégradés naturellement au cours du catabolisme protéique, et leur niveau passent en dessous du niveau protecteur entre six et seize semaines selon l'espèce. A partir de ce moment là, le jeune n'est alors plus protégé grâce aux anticorps maternels. Cette période correspond à une « phase critique » pour la vaccination se définit alors comme la période au cours de laquelle le taux d'anticorps maternels est insuffisant pour protéger le jeune contre les agents pathogènes mais assez important pour compromettre sa capacité à répondre à la vaccination.

Aussi, il est raisonnable de commencer un protocole de vaccination à partir de six

semaines en milieu exposé ou vers neuf semaines dans les conditions habituelles. Les injections peuvent alors être renouvelées toutes les deux à trois semaines jusqu'à l'âge de douze semaines. Cette injection vaccinale à trois mois est considérée comme la première injection de primo-vaccination afin de vacciner avec succès tous les animaux. Par ailleurs, les animaux n'ayant pas reçu de colostrum peuvent être vaccinés à partir de la deuxième semaine d'âge avec des vaccins à agents inactivés (période à partir de laquelle la capacité de répondre correctement à une stimulation antigénique est acquise), puis toutes les deux à trois semaines jusqu'à l'âge de trois mois (*Toma & al, 2008*)

II.7.4 Influences hormonales

Des déficits en hormone de croissance et en hormone thyroïdiennes sont responsables d'une diminution des réactions immunitaires à médiation humorale et cellulaire. A l'inverse, une augmentation du taux de thymosine (hormone thymique) permet une amélioration de la composante cellulaire de la réponse immunitaire ; une immunodépression est donc induite lors d'atrophie thymique

Par ailleurs, les effets respectifs de l'œstrus, de la gestation, de la lactation, de la production ou de l'utilisation excessive d'hormones sexuelles (hyperoestrogénisme lié à une tumeur des cellules de Sertoli, apport d'androgènes, de progestérone ou d'œstrogènes exogènes) ne sont actuellement pas clairement définis. La gestation serait associée à une baisse de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, nécessaire pour éviter un rejet du fœtus (*Lepretre, 2008*).

II.7.5 Médicaments

De nombreuses molécules ont un effet sur le système immunitaire et il est donc recommandé d'éviter de vacciner un animal ayant un traitement en cours, et plus particulièrement s'il s'agit de corticoïdes, de cyclophosphamide ou de cyclosporine A. La vaccination au moyen d'un vaccin antibactérien vivant est aussi à éviter en cas de traitement antibiotique en cours (*Lepretre, 2008*).

II.7.6 Immunodépression

Liée à une maladie intercurrente (maladie infectieuse, métabolique, endocrinienne, etc....) ou à une immunodéficience héréditaire, l'immunodépression constitue une contre-indication à la vaccination (**Lepretre, 2008**).

II.8. Evaluation de l'efficacité de la vaccination antirabique par la méthode Elisa

Les anticorps neutralisants antirabiques produits par l'organisme sont dirigés principalement contre la glycoprotéine G et à moindre degré contre la nucléoprotéine N. La protection contre la rage dépend donc de la présence d'anticorps anti-glycoprotéine G à un taux suffisant, dont le seuil est fixé à 0.5 UI/ml par l'OMS. A ce titre, la surveillance sérologique est appliquée pour attester de l'efficacité de la vaccination ou de son échec ; dans ce dernier cas, il sera indispensable de stimuler l'immunité par des injections de rappels.

L'activité est la capacité du vaccin à protéger l'animal vacciné contre la rage.

L'activité des vaccins antirabiques est déterminée, d'une part, par la réactivité croisée de la souche du virus rabique et, d'autre part, par la quantité d'antigène viral immunisant présente dans le vaccin. L'activité des vaccins inactivés doit être évaluée en mesurant la protection conférée par la vaccination aux espèces cibles lorsque celles-ci sont exposées au virus (homme) ou soumises à une épreuve virulente (animal).

L'activité peut être évaluée sur les espèces cibles, sur l'animal de laboratoire ou *in vitro*. Les valeurs minimales requises pour l'activité d'un vaccin sont exprimées en unités internationales (UI) (**Thraenhart, 1989**)

La vaccination a été considérée comme réussie si le titre en anticorps était supérieur ou égal à 0,5 EU/ml (**Bahloul et al, 2005**).

Chez l'animal, l'immunité antirabique post-vaccinale est appréciée le plus souvent par les méthodes indirectes, par la sérologie

Les méthodes de contrôle indirect sont réalisées sur le sérum des animaux vaccinés, et consistent à déterminer le taux d'anticorps neutralisants.

Il existe deux techniques basées sur la neutralisation virale et reconnue par l'OMS comme méthode de référence pour le titrage d'anticorps antirabique ; il s'agit de :

- L'épreuve de neutralisation virale par les anticorps fluorescents (FAVN).

- L'épreuve d'inhibition rapide des foyers fluorescents (RFFIT).

Ces deux méthodes, réalisables sur cellules BHK- 21, ont largement remplacé la neutralisation sur souris, du fait de leur coût plus avantageux et de la rapidité du résultat, par rapport à l'épreuve d'inoculation aux souris.

De nos jours, les méthodes immuno-enzymatiques sont plus fréquemment utilisées de part les nombreux avantages qu'elles présentent. Simples et rapides de réalisation, de plus elles ne requièrent pas la manipulation de virus vivant (**Moore & al, 2007**).

Evaluation de l'efficacité de la vaccination antirabique par la méthode Elisa

Le test ELISA « enzyme-Linked Immunosorbent Assay » repose sur la mise en évidence des complexes antigènes-anticorps par utilisation d'un marqueur enzymatique, lui-même révélabile par la transformation d'un substrat en un produit coloré (**Bazin et al, 1990**).

Dans le but d'évaluer l'immunité antirabique, l'Elisa indirecte est la méthode plus appropriée, elle permet le titrage des immunoglobulines dirigées contre la glycoprotéine rabique, elle se déroule en trois étapes principales :

- Mise en incubation de sérum à tester dans les cupules de la microplaque sensibilisées à la glycoprotéine rabique.
- Après un temps de lavage, un conjugué protéine A/péroxydase est ajouté. Ce dernier se lie aux immunoglobulines qui ont été capturées formant un complexe (antigène rabique)-(anticorps antirabiques) (protéine A/péroxydase).
- Un deuxième lavage est réalisé, un substrat de la péroxydase est ajouté, la réaction entre l'enzyme et son substrat se traduit par un changement de coloration (**OIE, 2008**).

Cette technique sera détaillée dans le chapitre matériel et méthode dans la partie consacrée au travail expérimental de ce mémoire.

I. OBJECTIFS

La rage canine sévit de manière enzootique en Algérie, et est à l'origine de plusieurs cas de rage humaine. La stratégie la plus efficace de lutte contre la rage repose sur la vaccination préventive des animaux. Le succès de cette vaccination est conditionné en tout premier lieu par le type de vaccin employé et les conditions pratiques de son utilisation.

La présente étude avait par conséquent pour objectif de contrôler d'une part les taux sérologiques de deux vaccins différents commercialisés en Algérie : un vaccin inactivé adjuvé et un vaccin inactivé non adjuvé.

Pour ce faire, des prélèvements ont été réalisés sur des chiens vaccinés par l'un des deux vaccins un an après leur primovaccination. Les titrages des anticorps antirabiques ont été déterminés par une méthode immunoenzymatique « ELISA ». Au niveau du laboratoire de recherche « santé et productions animales » de l'ENSV

II. MATERIEL & METHODES

II.1. POPULATION ETUDIEE & RECRUTEMENT DES ANIMAUX

Notre étude a porté sur une population de chiens d'une moyenne d'âge de 14 mois, incluant 26 males et 22 femelles, durant la période allant de février à Mai 2014

Les animaux participant à l'étude ont été présentés en clinique pour leur premier rappel de vaccination antirabique, un prélèvement sanguin a donc été effectué afin d'évaluer l'efficacité de la primovaccination un an après sa réalisation.

II.2. VACCINS UTILISES

Les chiens prélevés ont été regroupés en deux groupes, le premier a été vacciné avec un vaccin inactivé non adjuvé **Rabysiva** produit par le laboratoire **Syva** et le second par un vaccin inactivé adjuvé à l'hydroxide d'aluminium **Rabigen Mono** produit par les laboratoires **Virbac**

II.3. VACCINATION & PROTOCOLE DE PRELEVEMENT

II.3.1. PROTOCOLE VACCINAL

Les chiens ont été vaccinés selon les recommandations des fabricants des vaccins Rabysiva et Rabigen, qui stipulent une injection à partir de l'âge de 3 mois et un rappel annuel.

II.3.2. RECUEIL ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS SÉRIQUES

Les prélèvements ont été effectués un an après la primovaccination, sur la veine radiale.

Le sang a été recueilli sur tube sec puis centrifugé dans les heures qui suivent à 3000 tours/min/5min le sérum ainsi obtenu ont été mis dans des microtubes eppendorfs et congelés à -20° jusqu'à analyse.

II.4. ANALYSE SEROLOGIQUE

Les taux sérologiques conférés par chacun des vaccins étudiés ont été déterminés en utilisant un kit commercial ELISA, le test **SERELISA® Rabies Ab Indirect** élaboré par les laboratoires Synbiotics. Il s'agit d'un test ELISA indirect pour le titrage des anticorps chez les carnivores domestiques (chiens et chats).

II.4.1. PRINCIPE

L'essai repose sur une technique immuno-enzymatique ELISA indirecte. La phase solide est constituée d'une microplaque de 96 puits sensibilisée avec la glycoprotéine extraite de la membrane du virus rabique inactivé et purifié.

Les anticorps contenus dans le sérum qui se lieront aux antigènes adsorbés à la microplaque seront révélés par le conjugué enzymatique qui est constitué d'une protéine A de *Staphylococcus aureus* couplé à la peroxydase.

II.4.2. COMPOSITION DU KIT

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
6 Barrettes de 2 x 8 cupules sensibilisées par l'antigène rabique	Utiliser dans les 4 semaines après ouverture du sachet. Refermer le sachet après utilisation
Conjugué : Protéine A / peroxydase (CJ) (10 fois concentré)	Diluer 10 fois dans le diluant du conjugué et utiliser dans les 24 heures après dilution
Tampon substrat de la peroxydase (PS)	Prêt à l'emploi
Témoin négatif (N) (10 fois concentré)	Diluer 10 fois dans le diluant des échantillons et utiliser dans les 24 heures après dilution
Témoin positif (P) (10 fois concentré)	Diluer 10 fois dans le diluant des échantillons et utiliser dans les 24 heures après dilution
Diluant des échantillons (SD)	Prêt à l'emploi
Solution de lavage (W) (10 fois concentrée)	Diluer 10 fois en eau distillée ou déminéralisée. Utiliser dans les 48 heures après dilution.
Diluant du conjugué (CD)	Prêt à l'emploi
Solution d'arrêt (S)	Prêt à l'emploi
Film adhésive	6 films

II.4.3. APPAREILLAGES & MATERIELS

Appareillages

- Mélangeur Vortex®
- Bain marie
- Incubateur pour microplaques thermostaté à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Lecteur pour microplaques muni de filtres 450 et 620 nm (Lecteur Biotek)

Matériels

- Pipettes automatiques permettant la distribution de volumes de 10 à 1000 μl .
- Pipettes automatiques permettant la distribution de volume de 2 à 10 ml.
- Embouts pour micropipettes.
- Tubes à essais gradués coniques de 50 ml.
- Tubes à essais à usage unique.
- Portoirs pour tube.
- Bêchers.
- Eau distillée.
- Papier absorbant.
- Gants de latex à usage unique

II.4.4. PROTOCOLE OPERATOIRE

CN	CN	E1	E9	E17	E25	E33	E41					
CP	CP	E2	E10	E18	E26	E34	E42					
S6	S6	E3	E11	E19	E27	E35	E43					
S5	S5	E4	E12	E20	E28	E36	E44					
S4	S4	E5	E13	E21	E29	E37	E45					
S3	S3	E6	E14	E22	E30	E38	E46					
S2	S2	E7	E15	E23	E31	E39	E47					
S1	S1	E8	E16	E24	E32	E40	E48					

Figure 3 : Plan de distribution des sérums sur la microplaque

II.5) Procédure de l'essai

a. Décongélation des sérums

Les sérums ont été décongelés à température ambiante, puis chauffés au bain Marie à 56° pendant 30 minutes

b. Préparation des réactifs et des échantillons

Les échantillons ont été pré-dilués au 1/10 dans des microtubes (10 µl d'échantillon dans 90 µl de SD)

DEPOT DES ECHANTILLONS ET TEMOINS

Distribution des témoins

Les témoins ont été dilués au 1/10 puis 10 µl de témoin négatif et positif ainsi dilués ont été déposés respectivement dans les puits A1 et A2, B1 et B2.

La gamme de dilution a été préparée à partir d'un témoin titré à 4UE/ml dilué préalablement au 1/100 puis au 1/2 chaque fois (S6-S1)

Distribution des dilutions et échantillons

90 µl de diluant des échantillons ont été déposés dans les puits identifiés, dans lesquels 10 µl de chaque pré-dilution des échantillons au 1/10 effectuées préalablement ont été ajoutées.

La plaque a été recouverte avec un film adhésif, puis incubée 1 heure $\pm$ 5 min. à $+37 \pm 3^\circ\text{C}$.

Lavage

Après incubation 4 lavages ont été effectués

Ajout du conjugué

100 µl de conjugué dilué ont été distribués dans toutes les cupules puis la plaque a été recouverte par un film adhésif neuf.

La plaque a été incubée 1 heure $\pm$ 5 min. à $+37 \pm 3^\circ\text{C}$.

Lavage

4 lavages ont été réalisés à la fin de l'incubation

REVELATION

Ajout du substrat

100 μ l de substrat de la peroxydase (PS) ont été ajoutés puis la plaque a été laissée en incubation 30 ± 5 min à température ambiante à l'obscurité.

Ajout de la solution d'arrêt

Enfin 50 μ l de solution d'arrêt ont été ajoutés par cupule.

Mesure des densités optiques

Les densités optiques (DO) ont été mesurées en bichromatisme à 450 et 630 à l'aide d'un lecteur Elisa Biotek.

Les densités optiques ont ensuite été converties en Unité équivalent par millilitre par l'utilisation d'un tableur Excel conçu à cet effet.

III. Résultats & Discussion

La rage est une zoonose d'inoculation à l'issue fatale, maladie à distribution cosmopolite, elle sévit en particulier dans les pays d'Asie et d'Afrique dans lesquels elle est responsable de près de 55 000 décès annuellement (*OMS, 2010*).

En Algérie, la rage sévit à l'état enzootique, une moyenne de 800 cas animaux est relevée annuellement, l'espèce canine est la plus affectée, en effet, elle constitue plus de 50% des cas (*DSV, 2013*).

La stratégie de lutte contre la rage est principalement axée sur l'élimination des animaux errants, responsables de la propagation de la maladie, mais également sur la vaccination des animaux domestiques. Le contrôle de l'efficacité des vaccins antirabiques constitue par conséquent un point crucial en matière de prophylaxie médicale conditionnant le succès de toute stratégie d'éradication.

La présente étude a eu par conséquent pour principal objectif l'évaluation de l'efficacité de deux vaccins antirabiques inactivés utilisés en Algérie: l'un est adjuvé et l'autre non adjuvé.

Pour ce faire, nous avons eu recours à une technique immunoenzymatique « ELISA INDIRECT » qui permet simultanément la détection et le titrage des IgG anti-glycoprotéine du virus rabique. Le kit **SERELISA® Rabies Ab Indirect** utilisé, est produit par les laboratoires Synbiotics.

Le principe du test repose sur l'interaction de l'immunoglobuline IgG anti-glycoprotéine G, censé être présente dans le sérum à tester avec la glycoprotéine G purifiée et immobilisée sur la microplaque. Cette liaison est ensuite révélée par l'addition d'un conjugué enzymatique constitué de la protéine A staphylococcique couplée à une peroxydase.

Les résultats sont donnés par rapport aux taux de réussite et aux taux d'échec définis sur la base de l'intensité de la réponse humorale selon que le taux d'anticorps induit par la vaccination soit supérieur, égal ou inférieur à 0,5 EU/ml. La vaccination a été considérée comme réussie si le titre en anticorps était supérieur ou égal à 0,5 EU/ml (*Bahloul et al, 2005*).

III.1. Résultats Globaux de la vaccination par les vaccins inactives rabigen et rabisyva

L'analyse des prélèvements effectués un an après la vaccination a montré une séroconversion chez la majorité des chiens vaccinés (60,41 %) mais insuffisante pour les 39,58 % restants pour être protectrice.

Tableau 1 : taux de réussite global et taux d'échec global

TAUX DE REUSSITE	TAUX D'ECHEC
60,41% (29/48)	39,58% (19/48)

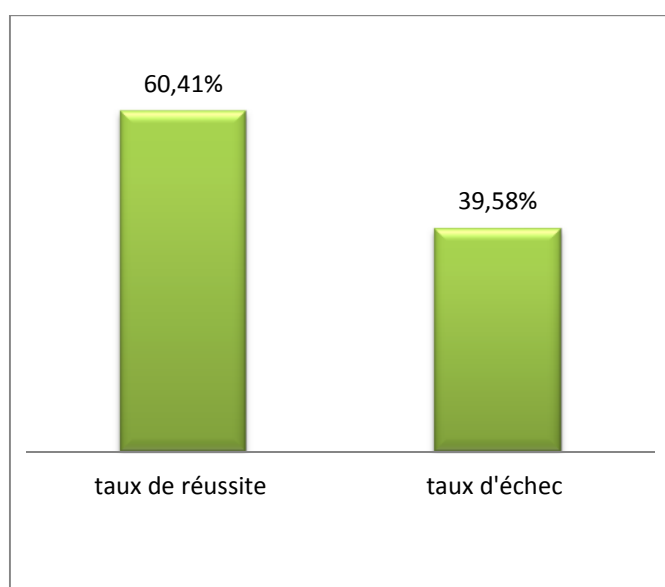


Figure 4: Représentation des taux globaux de réussite et d'échec un an après la primo-vaccination

Il est admis que les taux d'anticorps déclinent progressivement dans le temps suite à une vaccination (*Kindt et al, 2008, Male et al, 2007*). La décroissance des titres des anticorps dans le temps a été rapporté par la majorité des auteurs [*Haddad, 1987 (Tunisie)*; *Teepsumethanon et al 1991 (Thaïlande)*; *Koutchoukali et al, 1987 (France)*; *Mbou, 1992 (Sénégal)*; *Sage et al, 1993 (Alaska)*]. Cependant les taux d'échec différaient d'une étude à une autre. Ces variations pourraient être imputées au fait que les vaccins utilisés n'étaient pas toujours identiques dans toutes les études, et les protocoles de prélèvements ne l'étaient pas non plus.

III.2 Etude comparative des taux de réussite et des taux d'échec de la vaccination obtenus avec les vaccins inactives adjuvé et non adjuvé

L'étude des titres sérologiques obtenus après vaccination avec les vaccins inactivés adjuvé et non adjuvé a révélé une meilleure réponse vaccinale chez le groupe ayant reçu le vaccin inactivé adjuvé avec un taux de réussite de 84,21% (16/19), contre un taux de 44,82% (13/29) pour le groupe inoculé par le vaccin inactivé (*Tableau 2, Figure4*).

Tableau 2 : taux de réussite et taux d'échec de la vaccination par les vaccins inactivés adjuvés et non adjuvés

Type de Vaccin	TAUX DE REUSSITE	TAUX D'ECHEC
Inactivé adjuvé	84,21%	15,78%
Inactivé non adjuvé	44,82%	55,17%

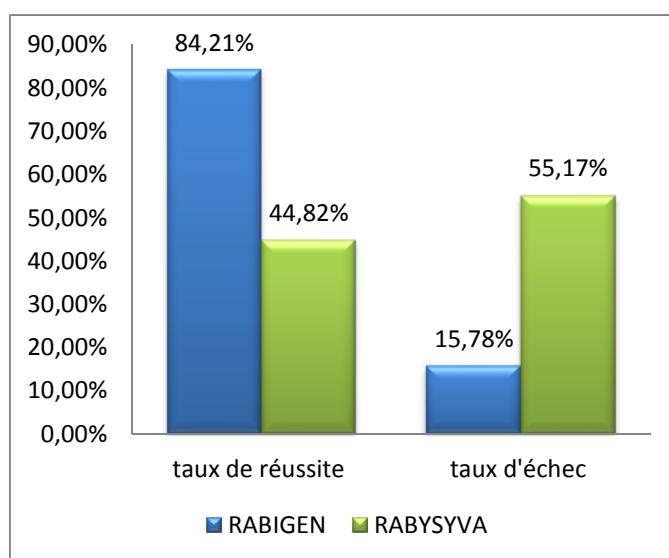


Figure 5 : Comparaison des taux de réussite et taux d'échec obtenus avec le vaccin inactivé adjuvé (Rabigen) versus vaccin inactivé non adjuvé (Rabisyva)

L'étude de l'efficacité des deux vaccins testés, a montré un taux de réussite nettement plus important chez les chiens vaccinés avec le vaccin inactivé adjuvé que chez ceux vaccinés avec le vaccin inactivé. En effet, sur les 19 chiens vaccinés avec le vaccin inactivé adjuvé 16 ont présenté des taux variant de 0,5 à plus de 4 EU/ml un an après la primo-vaccination, contre seulement 13 sur 29 pour le vaccin inactivé.

Ces résultats tendent à confirmer la validité du schéma vaccinal préconisé par le fabricant du vaccin inactivé adjuvé, en effet, une injection unique de ce vaccin pourrait donc suffire à immuniser les chiens inoculés, il reste néanmoins à souligner que 3 chiens sur les 19 vaccinés ne bénéficient pas de cette protection vaccinale. Ce ci pourrait être imputé à plusieurs facteurs extrinsèques, liés aux conditions générales des chiens (alimentation, état de santé....). nous rappelons que nous ne sommes intervenus que pour la prise de sang un an après la vaccination et nous ne pouvons pas par conséquent préjuger de antécédents vaccinaux des animaux

Concernant la vaccination par le vaccin inactivé non adjuvé, un taux de réussite nettement inférieur à celui obtenu suite à la vaccination par le vaccin inactivé adjuvé a été noté. Cette importante baisse de protection chez les chiens vaccinés avec le vaccin inactivé non adjuvé, pourraient être liée au fait que le vaccin utilisé soit non adjuvé.

En effet, les vaccins inactivés étant faiblement immunogènes nécessitent l'addition d'adjuvants : substances minérales ou organiques dont le rôle est d'augmenter l'immunogénicité des vaccins, ils agissent soit par un effet dépôt c'est-à-dire que l'antigène vaccinal est concentré et retenu au site de l'injection permettant ainsi sa présentation prolongée aux cellules immunitaires, soit par l'induction de cytokines qui contrôlent les fonctions des lymphocytes (*Male et al, 2007*).

Une seule injection d'un vaccin adjuvé devrait suffire à conférer une protection satisfaisante. Dans le cas de notre étude, et afin de palier à ce manque d'immunité induit par les vaccins inactivés non adjuvés, il serait judicieux d'effectuer deux injections du vaccin inactivé non adjuvé à 15 ou 30 jours d'intervalle, la seconde injection aura pour but de stimuler l'immunité ; une réponse secondaire à un même antigène est plus importante qu'une réponse primaire.

En France, une étude menée par Koutchoukali et collaborateurs (1987), a montré qu'une injection unique de vaccin adjuvé d'hydroxyde d'aluminium à chiens naïfs de toute vaccination antirabique induisait une réponse vaccinale de niveau globalement supérieure

(taux de réussite égal à 99% an un après une primo-vaccination) à celle induite par deux injections de vaccin non adjuvé (77%).

Dans le cas de la présente étude, il s'agissait d'une primo-vaccination antirabique, le taux d'échec global a été estimé à 39,58%, soit 19 chiens sur 48 ont vu leur titre décroître en dessous du seuil de protection un an après la vaccination, ces échecs concernaient en majorité les chiens vaccinés par le vaccin inactivé non adjuvé largement utilisé actuellement en Algérie. Nous préconisons par conséquent, dans ce cas particulier de recommander fortement une seconde injection de rappel de vaccination antirabique chez les chiens primo-vaccinés afin d'optimiser leur niveau de protection, la rage étant zoonose potentiellement mortelle, ne tolérant aucun déficit vaccinal.

IV. Conclusion

A l'état actuel, l'Algérie est un pays enzootique de rage, par conséquent la prophylaxie contre cette maladie doit être de rigueur.

Les résultats obtenus aux fins de cette étude ont mis en évidence une meilleure couverture vaccinale des chiens inoculés par le vaccin inactivé adjuvé, que ceux vaccinés par le vaccin inactivé non adjuvé. Le taux d'échec relativement important suscité par ce dernier devrait être revu à la baisse en corrigeant le protocole de vaccination qui nécessite deux injections au lieu d'une compte tenu de la nature du vaccin (vaccin inactivé non adjuvé).

La vaccination étant un des piliers principaux de la prophylaxie contre la rage, doit faire objet de contrôle sérologique afin d'optimiser la réussite du plan de lutte.

Résumé

La rage est une zoonose virale, cosmopolite, qui sévit dans plus de 150 pays. En Algérie, où elle sévit encore sous forme enzootique, le chien étant le plus atteint. Il représente 50 % des cas enregistré et est souvent à l'origine de la rage chez l'Homme.

La vaccination constitue le pilier de la prophylaxie antirabique, c'est de l'efficacité de cet acte que dépend en grande partie le succès du programme lutte.

La présente étude a eu par conséquent pour principal objectif l'évaluation de l'efficacité de deux vaccins antirabiques utilisés en Algérie: un vaccin inactivé adjuvé et un vaccin inactivé non adjuvé, par une méthode sérologique l'ELISA . Les résultats obtenus au terme de cette étude ont montré une meilleure réponse des chiens contre le vaccin inactivé adjuvé avec un taux de réussite de 84,21% contre 44,82% pour le vaccin inactivé non adjuvé

Abstract

Rabies is a viral zoonosis, cosmopolitan, afflicting more than 150 countries. In Algeria, where it still endemic dogs are the most affected, accounting for 50% of cases registered and is often the cause of rabies in humans. Vaccination is the mainstay of prophylaxis against rabies and the effectiveness of that measure determines largely the success of the struggle. The main objective of the present study was therefore the evaluation of the effectiveness of two inactivated rabies vaccines: the first is adjuvanted and the second one is not. The sera were analyzed by an indirect ELISA immunoassay. The results obtained after this study showed a better response from dogs receiving the adjuvanted vaccine with a success rate of 84,21% against 44,82% for those inoculated with inactivated vaccine.

ملخص

داء الكلب مرض فيروسي حيواني المنشأ، عالمية، تعاني منها أكثر من 150 بلدا. في الجزائر، حيث ما زالت سائدة في شكل المستوطنة، والكلب هو الأكثر تضررا. لأنها تمثل 50٪ من الحالات المسجلة وغالبا ما يكون سبب داء الكلب في البشر.

التطعيم هو أساس الوقاية من داء الكلب من فعالية هذا العمل تتحدد نسبة نجاح برنامج الوقاية.

كانت الدراسة بالتالي فإن الهدف الرئيسي من تقييم فعالية اثنين من لقاحات داء الكلب المستخدمة في الجزائر: لقاح المعطل المساند المصلية. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في نهاية هذه الدراسة استجابة أفضل في ايليزا ولقاح معطل غير المساند، طريقة الكلاب ضد اللقاح المعطل المساند مع نسبة نجاح 84.21٪ مقابل 44.82٪ لقاح معطل غير المساند

Références bibliographiques

Aubry P. et Rotivel Y., 2001 : Rage. Encyclopédie Médico-Chirurgicale (Elsevier Masson SAS, Paris) Maladies infectieuses 8-065-C-10, 2001. 16p. Maladies infectieuses 8-065-C-10, 2001. 16p.

Bahloul C, Taieb D, Kaabi B, Diouani MF, Ben Hadjahmed S, Chtourou Y, 2005.
Comparative evaluation of specific ELISA and RFFIT antibody assays in the assessment of dog immunity against rabies. *Epidemiol Infect* 2005;133(4):749–57

Blancou J., 1997 : Surveillance et prophylaxie de la rage animale dans le monde. OIE : manuscrit N° 1879 « EDITORIAL ».

Desmettre P. & Chappuis G., 1990, vaccins et vaccination ; Chapitre 68 : 699- 703. Immunologie animale « Flammarion » 737p.

DSV 2013 : bulletin sanitaire vétérinaire 2010

Eloit M., 1998 : Vaccins traditionnels et vaccins recombinants. INRA production animale 1998, 11 (1), 5-13.

Eloit, Haddad, 2012). Rage chez le chien et le chat. EMC vétérinaire 2012. 9 (3) 1-13. MG article 0800

Fleury H.J.A., 2009 : Virologie humaine : connaissance et pratique. 5^{ème} édition Elsevier Masson. 267 p. 154.

GORHAM JR 1986: GORHAM JR. Vaccines and principles of immunization. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*,1986, **16**, 1205-1225

Haddad N., 1987: Évaluation par la sérologie de l'efficacité d'un vaccin antirabique chez des chiens du terrain en Tunisie. *Ann Rech Vet* 18 : 63-67.

Kindt T.J., Goldsby A.R., Osborne B.A., 2008 : Immunologie. Le cours de Janis Kuby avec questions de revision. Edition 6. DUNOD. 683p. (484-499).

Koutchoukali M.A., Blancou J., Chappuis G., Tixier G., Eloit M., Ganiere J.P., Chantal J., Simon., Berthier A et Toma B., 1985 : réponse sérologique du chien après primovaccination antirabique à l'aide de vaccins adjuvés ou non. *Ann Rech Vet* 16(4) : 345-349.

Leprêtre C. 2009 : La vaccination des carnivores domestiques en 2008. Thèse Médecine Vétérinaire ; Ecole vétérinaire d'Alfort 90p.

M'bou G 1992, Evaluation de la couverture immunitaire Antirabique après vaccination de masse. Dans la commune de Pikine. *Thèse Med. Vét.* Faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar. 72 pages.

Male D., Brostoff J., Roth D.B., Roitt I., 2007: Immunologie Edition 7. Elsevier. 600p.

OIE, 2005, Rage chapitre 2.2.5: Manuel terrestre de l'OIE. <http://www.oie.int/fr/>

OMS 2013 : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/fr/>

PASTORET PP 1997: PASTORET PP, BLANCOU J, VANNIER P, VERSCHUEREN C, editors. *Veterinary vaccinology*. Amsterdam: Elsevier science B.V., 1997, 519-580.

REVILLARD JP 2007: REVILLARD JP. Réponses immunitaires induites par l'introduction d'antigènes dans l'organisme. In : *Immunologie*. 4th ed., Bruxelles : De Boeck Université, 2001, 219-235.

Ribadeau Dumas F., Dacheux L., Goudal M., Bourhy H., 2010 : Rage. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Maladies infectieuses, 8-065 –C-10

ROTH JA 2003: ROTH JA. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *J. Vet. Intern. Med.*, 2003, **17**, 273–281

Rotivel Y., Goudal M., 2007 : Rage. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Pédiatrie/Maladies infectieuses 4-284-B-10.

SAALMÜLLER A 2006 : SAALMÜLLER A. New understanding of immunological mechanisms. *Vet. Microbiol.*, 2006,

Sage G., Khawplod P., Wilde H., Lobaugh C., Hemachudha T., Tepsumethanon W. et Lumlerdaecha B., 1993: Immune response to rabies vaccine in Alaskan dogs: failure to achieve a consistently protective antibody response. *Transactions of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene* (1993) **87**, 593-595.

SCHIJNS VECJ 1997: SCHIJNS VECJ. General description of vaccines. In: PASTORET PP, BLANCOU J, VANNIER P, VERSCHUEREN C, editors. *Veterinary vaccinology*. Amsterdam: Elsevier science B.V., 1997, 131-158.

Tepsumethanon W. , Polsuwan C , Lumlerdaecha B., Khawplod P., Hemachudha T. , Chutivongs S., Wilde H. , Chiewbamrungrat M . & Phanuphak P. 1991: Immune response to rabies vaccine in Thai dogs: A Preliminary Report. *Vaccine*, **9**, 627-630

TOMA B., 2006 : La Rage. Polycopié de cours de pathologie infectieuse des écoles

Toma B., Dufour B., Sanaa M., Bénet J.J., Shaw A., Moutou F., et Louzã A., 2008 : Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. 2^{ème} Edition AEEMA. 696p.

Th. RAEN HART. O1989 Evolution de l'innocuité et de l'activité des vaccins antirabiques. *Rev.sci.tech.off.int.epiz.*1989, **8**(4) _845-847