

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة - الجزائر

École Nationale Supérieure Vétérinaire — Alger

PROJET DE FIN D'ETUDE

EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE DOCTEUR VETERINAIRE

THEME:

***EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA
VACCINATION ANTIRABIQUE***

Présenté par : ASSOUL Nesrine

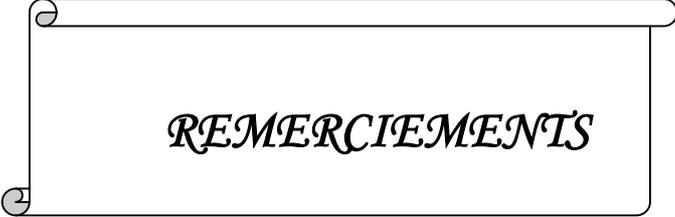
DERGUINI Medina S

Soutenu le : 07/07/2011.

Le jury :

- Présidente Mme AIT OUDHIA, K. Maitre de conférences de classe A ENSV Alger
- Promoteur Melle BENMAHDI, M.H Professeur ENSV Alger
- Examineur Mr GOUCEM, R Maître assistant de classe B ENSV Alger
- Examineur Mr MOHAMMEDI, D Maitre assistant de classe A ENSV Alger

Année universitaire : 2010/2011.



REMERCIEMENTS

Au Professeur GUEZLANE LOUARDI notre directeur,

Pour ses encouragements, sa patience, son sens élevé de la rigueur et de la responsabilité et pour tous les moyens pédagogiques mis à notre disposition.

Au Professeur BEN MAHDI MERIEM HIND, Notre promotrice.

Pour ses conseils éclairés, son soutien indéfectible, son assistance, sa disponibilité et sa générosité.

A Melle AIT OUDHIA. KH notre présidente de jury,

Pour ces qualités professionnelles et humaines, ses orientations, ses conseils, sa disponibilité, sa générosité.

A Messieurs MOHAMMEDI. D & GOUCEM ,R.

Qui ont accepté d'examiner notre travail.

Sincères remerciement

Ainsi qu'à tous nos amis de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire.

Dédicaces

A mon premier rempart :

Mes très chers parents qui, après m'avoir mis au monde, m'ont éclairé de leurs conseils, soutenu, orienté et surtout cru en leur fille.

Mes frères Mohamed Amine & Adel pour leur soutien, leur compréhension, et leur confiance.

A ma grande sœur Nassima pour son soutien, sa compréhension, et surtout pour avoir pu me supporter ces cinq dernières années.

A mes regrettés grands parents paternels ravis à nous prématurément mais dont le souvenir restera vivace, gravé dans ma mémoire pour l'éternité.

Mes grands parents maternels pour leur douceur, leur gentillesse, et leur Baraka.

Mes oncles et tantes paternels et maternels.

A ma cousine Amina qui m'a toujours soutenu.

A mon deuxième rempart :

Mes éminents professeurs et enseignants de l'ENSV pour leur générosité, leur soutien, et surtout pour le savoir qu'ils et elles nous ont enseigné

Au professeur Ben Mahdi M.H

Au Dr Ait-Oudhia .KH

Au Dr Zaouani

A très ma chère amie binôme Derguini Medina avec qui il m'a été agréable de travailler, et pour tous les bons moments passé ensemble.

A ma très chère amie Ayda Boutella , et tous mes amis de l'ENSV avec qui j'ai passé cinq belles années de ma vie.

Assoul Nesrine

Dédicaces

A mes parents, qui ont toujours cru en moi, soutenue, encouragée et accompagnée durant toutes mes études.

A mon grand frère Mohamed Tahar pour ses encouragements et son soutien, ainsi qu'à ma belle sœur Sabrina.

A mes oncles Mohamed et Abdeltif Benkhilil ainsi que leurs épouses pour leurs aide, leurs encouragements et leurs conseils.

A monsieur et madame Benkhilil Yacine et Soraya pour tous les enseignements qu'ils m'ont prodigués pendant mes années de lycée.

A tous mes cousins et cousines en particulier : Omar, Mohamed Islem, Hassen et Amine.

A ma tante Dr. Boudiaf Derguini Nora (INMV) pour sa précieuse aide.

Au Dr. Yousfi Halim, (INMV) pour son aide.

A ma grande mère pour sa générosité, ses encouragements et sa baraka.

A ma binôme et amie Assoul Nesrine avec qui il m'a été agréable de travailler, et pour tous les bons moments passés en sa compagnie.

A mon amie Meriem Guessoum pour son aide et ses conseils.

A toutes mes amies.

A mon amie Ayda Boutella pour les cinq années passées ensemble.

Au Pr. Ben Mahdi Meriem Hind pour ses enseignements et ses conseils.

Au Dr. Ait-Oudhia Khatima pour sa présence, ses conseils et son soutien.

Ce travail est à la mémoire de mes défunts grands parents

Derguini El hachemi et Zakia, a Benkhilil Boualem

qui nous ont quitté prématurément, et qui auraient fiers de leur petite-fille aujourd'hui.

Derguini Medina S.

SOMMAIRE

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION.....	01
I. HISTORIQUE DE LA RAGE ET DECOUVERTE DU VACCIN.....	02
I.1. Définition et synonymie.....	02
I.2. Historique et découverte du vaccin.....	02
II. SITUATION DE LA RAGE EN ALGERIE ET MOYEN DE LUTTE.....	03
III. IMPORTANCE DE LA VACCINATION.....	07
IV. LE VACCIN ANTIRABIQUE.....	08
IV.1. Définition d'un vaccin.....	08
IV.2. Composition d'un vaccin.....	08
IV.2.1. Antigènes vaccinaux	08
IV.2.2. Adjuvant	09
IV.2.3. Résidus de processus de fabrication	09
IV.2.4. Les conservateurs	09
IV.2.5. Les contaminants	09
IV.2.6. Le milieu liquide	09
IV.1.3. Les différents types de vaccins	09
IV.1.3.1 Vaccins à agent vivant.....	09
IV.1.3.2. Vaccins immunisant à ADN.....	10
IV.1.3.3 .Vaccins à agents inertes.....	11

IV.1.3.4. Vaccins homologues et hétérologues.....	12
IV.3. Mode d'administration.....	12
IV.3.1. Voie parentérale	12
IV.3.2. Voie orale	12
V. Protocole vaccinal.....	13
V.1. Age de la vaccination.....	13
V.2. Conservation des vaccins.....	13
V.3. Mode de vaccination des différentes souches.....	14
V.3.1. Vaccins à virus vivant atténués.....	14
V.3.1.1. FLURY.....	14
V.3.1.2. KLEVE.....	14
V.3.1.3. ERA.....	14
V.3.2. Vaccins à virus inactivés.....	14
V.3.2.1. Carnivores domestiques.....	14
V.3.2.2. Les herbivores.....	15
V.4. Résultats de la vaccination.....	15
V.5. Les échecs de la vaccination.....	15
V.6. Effets secondaires des vaccins.....	15
V.7. Les vaccins disponibles sur le marché.....	16
VI. DIFFERENTES TECHNIQUES DE L'EVALUATION DE L'EFFICACITE DU VACCIN ANTIRABIQUE.....	19

VI.1. Contrôle du produit fini.....	19
VI.1.1. Test de Habel.....	19
VI.1.2. Test National institutes of health (NIH).....	20
VI.2. contrôle sur l’animal ou l’espèce cible.....	20
VI.2.1. Contrôle direct.....	20
VI.2.2. Contrôle indirect.....	21
PARTIE EXPERIMENTALE	
I. Objectif.....	23
II. Matériels & Méthodes.....	23
II.1. Animaux étudiés, durée et lieux de l’expérimentation.....	23
II.2. Nature du prélèvement.....	23
II.3.Equipements et consommables utilisés.....	25
II.4. Trousse PALETILIA TM RABIES II.....	26
II.4.1.Composition du kit.....	26
II.4.2.Préparation des réactifs.....	27
II.4.3Préparation de la gamme de quantification pour un test quantitatif.....	28
II.4.4.Echantillon.....	29
II.4.5.Description de la technique.....	30
III. Résultats& Discussion.....	34
IV. Conclusion.....	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Cas de rage humaine en Algérie entre 2000 et 2009.	5
Figure 2	Comparaison entre les cas de rage humaine entre les années 90 et 2000.	5
Figure 3	Cas de rage animale dans les années 2000	6
Figure 4	Distribution des cas de rage humaine en Algérie entre 2000 et 2010	6
Figure 5	Méthode de prélèvement sanguin	24
Figure 6	Prélèvements sanguins après centrifugation.	24
Figure 7	Trousse PALETETELIA TM RABIES II.	26
Figure 8	Réactifs utilisés	29
Figure 9	Micro-tubes contenant les différents sérums.	29
Figure 10	Microplaque après ajout des différents réactifs et des sérums.	30
Figure 11	Incubation de la microplaque.	31
Figure 12	Microplaque après ajout du conjuguais R7.	31
Figure 13	Protection de la microplaque à l'abri de la lumière.	32
Figure 14	Microplaque après incubation à température ambiante.	32
Figure 15	Préparation de la solution d'arrêt	33
Figure 16	Microplaque après ajout de la solution d'arrêt.	33
Figure 17	Lecteur de microplaque "BDSN Immunoskan.", Filtre de 450 à 650nm.	34
Figure 18	Pourcentage des chiens immunisés et non immunisés	35
Figure 19	Pourcentage de chiens immunisés de la catégorie « A ».	36
Figure 20	Nombre de chiens immunisés et non immunisés selon le type de vaccin.	37
Figure 21	Pourcentage de sujets immunisés dans la catégorie « B ».	38

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Les vaccins disponibles actuellement sur le marché algérien	16
Tableau 2	Les composants du kit ELISA (Trousse PALETELIA TM RABIES II)	27
Tableau 3	Préparation de la gamme de quantification pour un test quantitatif	28
Tableau 4	Plan de distribution pour la methode quantitative	30
Tableau 5	Effectif total des chiens immunisés et non immunisés selon le type de vaccin	36

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN Acide désoxyribonucléique.

ARNm acide ribonucleique messenger

HEP High Egg Passage

LEP Low Egg Passage

CMH complexe majeur d'histocompatibilité

SEM Semaine

EQ Equidés

BV Bovins

CN Chiens

CT Chat

OV Ovins

CA Canins

FE Félines

IM Intramusculaire

SC Sous cutané

Partie
Bibliographique

INTRODUCTION

La rage est une zoonose cosmopolite, responsable de plusieurs dizaines de morts chaque année dans le monde (OMS, 2005). Elle est généralement transmise par morsure des animaux à sang chaud (carnivores domestiques et sauvages, ruminants, chauves-souris...). Cette pathologie est extrêmement dangereuse, voire mortelle en l'absence de traitement. Ce dernier étant inefficace après l'apparition des premiers symptômes, D'où l'importance de mettre en œuvre des mesures préventives et défensives pour lutter contre cette maladie.

En plus des mesures d'éradication, la prophylaxie contre la rage est essentiellement médicale et repose sur la vaccination des animaux domestiques et sauvages et des personnes à risque (vétérinaires, animaliers, gardes forestiers...).

En Algérie, plusieurs vaccins antirabiques sont utilisés pour la vaccination des animaux, l'un vivant atténué est produit à l'Institut Pasteur d'Algérie, les autres le sont par des laboratoires étrangers.

La vaccination bien qu'obligatoire n'est pas toujours respectée par les propriétaires. Et si elle est effectuée, le protocole n'est pas suivi rigoureusement mais les campagnes de vaccination antirabique pour les animaux de rente sont limitées aux foyers suspects de rage uniquement.

Par conséquent ce présent travail a eu pour objectif l'évaluation de l'efficacité de différents vaccins utilisés en Algérie sur un effectif de chiens comprenant des sujets présentés à la consultation de la clinique de l'Ecole National Supérieure Vétérinaire et de chiens recrutés au niveau d'élevages canins de la wilaya d'Alger.

Le présent mémoire comporte à cet effet :

Une première partie consacrée à une synthèse bibliographique reprenant : Historique de la rage et découverte du vaccin ; Situation de la rage en Algérie et moyen de lutte ; Importance de la vaccination ; Le vaccin antirabique. ; Protocole vaccinal. ; Différentes techniques de l'évaluation de l'efficacité du vaccin antirabique.

Une seconde partie, détaillant notre travail expérimental, les matériels et méthodes adoptés y seront présentés et les résultats analysés et discutés.

I. HISTORIQUE DE LA RAGE

I.1. Définition et synonymie

La rage est une maladie infectieuse (LEPINE & GAMET, 1969), virulente, inoculable généralement par morsure. C'est une maladie neurologique commune à l'homme et à la plupart des espèces animales, due à un Rhabdovirus (ENVF, 1990).

Sur le plan clinique, elle se caractérise, après une longue période d'incubation, par une encéphalomyélite mortelle en règle générale, accompagnée le plus souvent de signes d'excitation, d'agressivité ou de paralysie.

Sur le plan histologique, la signature de l'infection rabique est matérialisée par la présence d'inclusions cytoplasmiques acidophiles dans certaines cellules nerveuse : « les corps de NEGRI » (ENVF, 1990).

Zoonose majeure, elle est classée comme une maladie réputée légalement contagieuse.

I.2. Historique et découverte du vaccin

La rage est une maladie très ancienne, peut être aussi vieille que l'humanité. Déjà, 3000 ans avant J.C. on retrouve l'origine du mot rage dans la langue Sanskrite ou « Rabhas » qui signifie « faire violence ». La rage des animaux sauvages ou domestiques transmise à l'homme par morsure est connue depuis la plus haute antiquité. Mais **AULUIS CORNELUIS CELSE**, médecin du siècle d'auguste, fut le premier à faire la relation entre la maladie de l'homme et la morsure du chien.

Les recherches de **Galtier** professeur à l'Ecole Vétérinaire de Lyon (GALTIER, 1881), en 1879 apportent les premiers résultats expérimentaux valables : contagiosité de la salive, innocuité habituelle du sang, transmission au lapin par voie intra sciatique ce qui démontra que la propagation du virus se faisait par voie nerveuse.

Pasteur avec **Chamberland**, **Roux** et **Thuillier**, effectuèrent des passages en série du virus par inoculation intra-cérébrale au lapin pour obtenir un virus « fixe » qui, après «atténuation» par dessiccation, a été utilisé pour la vaccination antirabique (méthode des moelles), pour la première fois le 6 juillet 1885 sur le jeune berger Alsacien de 9ans **Joseph Meister** mordu cruellement par un chien enragé (LEPINE & GAMET, 1969).

La vaccination a été une réussite, l'enfant fut sauvé. Fort de son succès, le biologiste réalisera plus de 350 inoculations en un an. Il profitera de sa renommée pour lancer une souscription qui permettra de créer l'institut qui porte son nom. Avec ses collaborateurs, Calmette, Roux et Chamberlan, il avait commencé ses recherches en 1880 et était parvenu, par la suite, à isoler les germes responsables de la rage.

Ultérieurement, nombreux travaux suivirent dans le domaine du diagnostic, du traitement, de l'épidémiologie, dans la connaissance de la structure du virus, de l'immunologie, de la pathogénie ...

II. SITUATION DE LA RAGE EN ALGERIE ET LES MOYENS DE LUTTE MIS EN ŒUVRE :

La rage humaine bien qu'éradiquée dans certains pays développés est toujours présente en Algérie avec toutefois certaines régions qui sont relativement épargnées.

Entre 2000 et 2009, le nombre de cas de rage humaine a suivi une courbe exponentielle passant de 16 cas en 2000 à 32 cas en 2007 (BENAHBYLES, 2009).

Les régions du nord semblent être les plus atteintes, avec une prédominance des foyers au niveau de : Sétif et Chlef (12 cas) Tizi Ouzou (9 cas), Alger et Tlemcen (8 cas) (INSP, 2011).

Les régions du sud sont relativement épargnées, mis à part El Bayadh où ont été signalés quatre cas au cours de l'année 2008, Laghouat avec deux cas et Djelfa avec un cas entre 2000 et 2009 (INSP, 2011).

Cette absence de cas de rage au sud s'explique par, d'une part, le climat très aride du désert et d'autre part par l'éloignement des villes. Mais ce constat tendrait à s'invalider par la construction de nouvelles villes et la conquête du désert par l'homme. Dans un futur proche, il ne serait pas impossible d'observer des cas de rage humaine dans des régions jusque là épargnées (BENAHBYLES, Avril 2008).

La rage est, certes, une maladie mortelle mais il existe des traitements adéquats ; le manque d'informations associé à l'ignorance de la gravité de la maladie par la population est l'une des causes majeures de la mortalité. En effet, la majorité des personnes (60%) ne se

présentent aux centres de santé que le lendemain voire plusieurs jours après la morsure, et parfois seulement après l'apparition des premiers signes de rage.

La mortalité constatée chez les quarante pour cent restant qui se présentent immédiatement après la morsure, est généralement due :

- Au non suivi du traitement.
- Au retard des injections (jour de repos hebdomadaire).
- Arrêt du traitement après la première injection.
- Refus de la vaccination par la personne mordue.

D'autres causes possibles sont à relever :

- Rupture de fourniture des vaccins ;
- Conditions médiocres de stockage des vaccins (rupture de la chaîne du froid notamment).

La vaccination ainsi que la sérothérapie est gratuite pour toute personne mordue ou griffée, à titre préventif ou curatif.

La répartition géographique des cas de rage animale est identique à celle de la rage humaine, pour cause, les animaux sont les principaux réservoirs de contamination, surtout le chien suivi du chat et enfin du bovin (BENAHBYLES, avril 2008). Des cas de contamination par le chacal ont été constatés dans les régions à forte densité de cet animal. La région de Sétif comptabilise quant à elle, le plus grand nombre.

En 2000 on a constaté une baisse avec 616 cas contre 1025 en 1999. Mais une hausse a été constatée entre 2001 et 2004 avec un pic de 988 cas suivi d'une légère baisse en 2005 et 2006 avec respectivement : 941 et 936 cas (INSP, 2011).

L'Etat algérien a mis en place un dispositif de lutte contre la rage humaine et animale par la promulgation des textes de lois repris en annexe 1.

D'autres mesures ont été prises à savoir:

- Vaccination obligatoire des animaux domestiques, du cheptel bovins et des animaux sauvages ;

- Prise en charge des personnes ayant été en contact avec un animal enragé ou suspect.
- Elimination systématique des animaux errants par les services de l'HURBAL ;
- Sensibilisation de la population (dépliants, conférences, médias lourds...)
- Malgré toutes ces mesures la rage animale est toujours en constante augmentation et par extension la rage humaine.

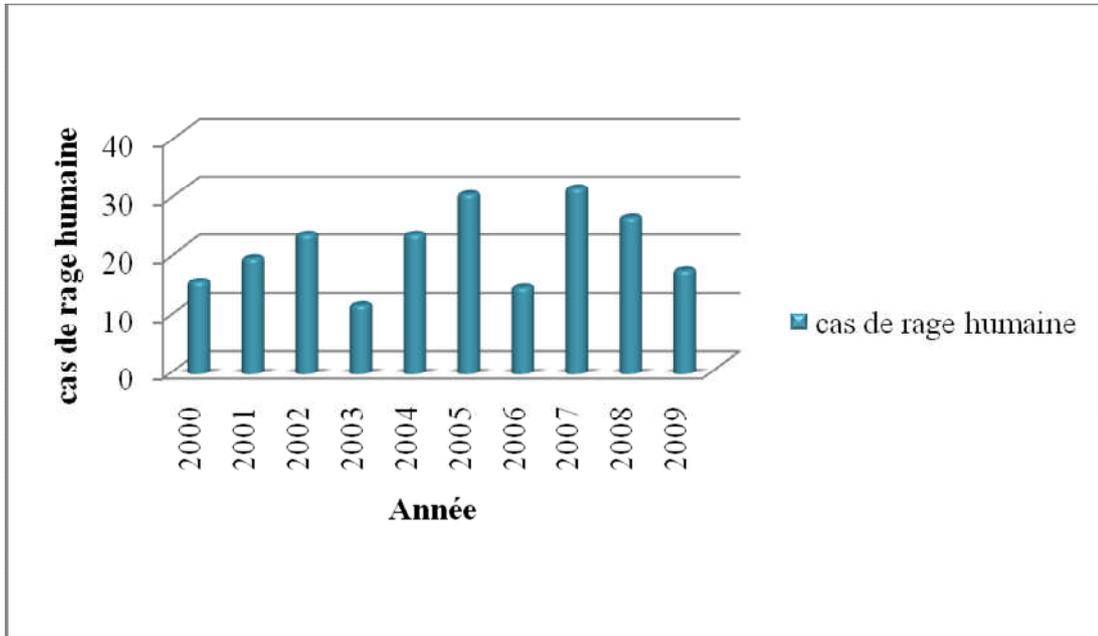


Figure 1: Cas de rage humaine en Algérie entre 2000 et 2009 (INSP, 2011).

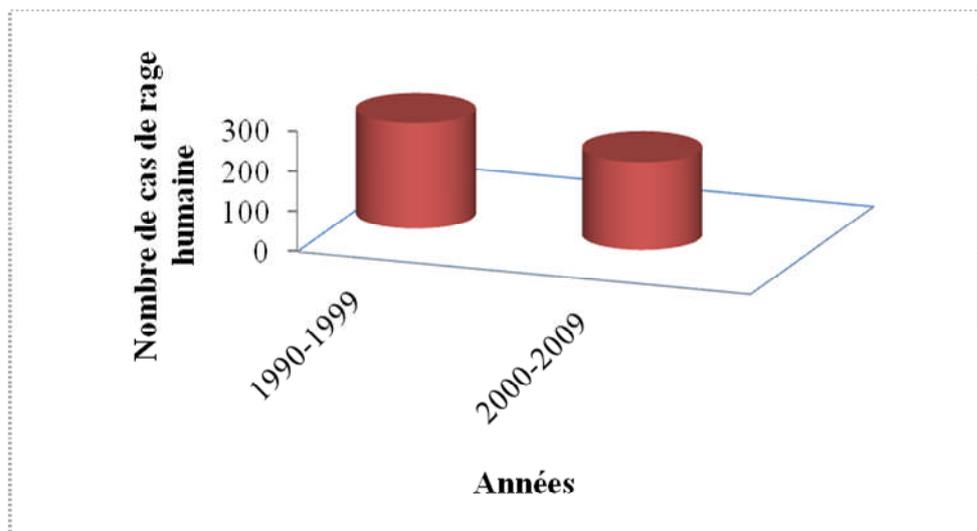


Figure 2 : Comparaison entre les cas de rage humaine entre les années 90 et 2000. (INSP, 2009)

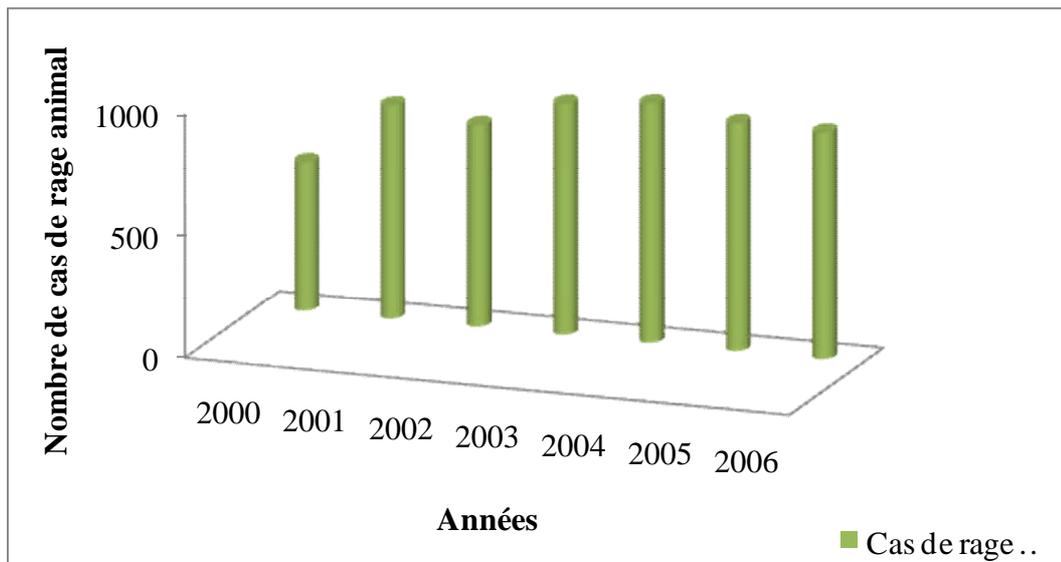


Figure 3 : Cas de rage animale dans les années 2000 (INSP, 2011).

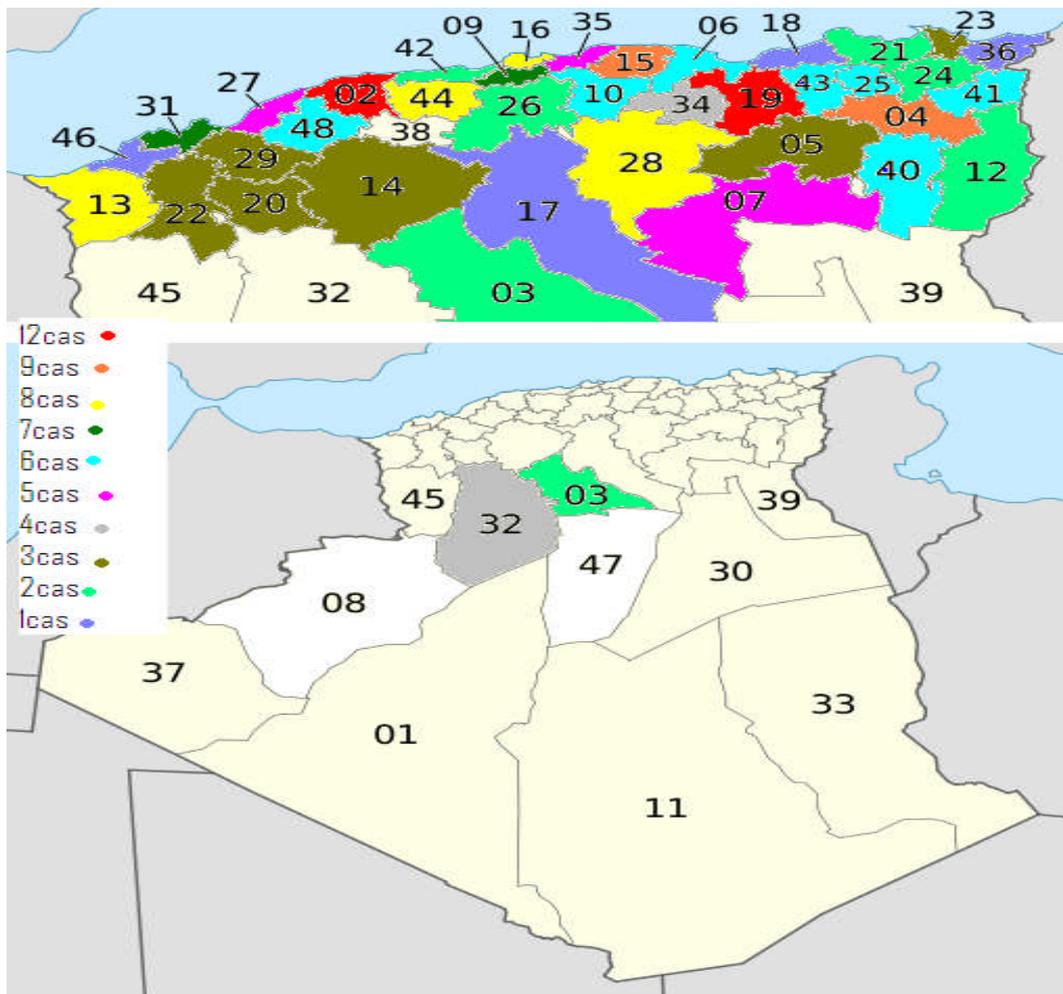


Figure 4: Distribution des cas de rage humaine en Algérie entre 2000 et 2010 (INSP)

III. IMPORTANCE DE LA VACCINATION :

Durant la dernière décennie on dénombrait 40 964 morts de rage parmi les animaux domestiques européens (d'après le bulletin du Centre OMS deTübingen), 150 894 de leurs congénères sauvages étaient reconnus enrégés par examen de laboratoire. Sachant que de tels examens ne portent que sur 10 à 20 % des sujets réellement morts dans la nature, on mesure l'ampleur de l'impact qu'a eu l'épidémie sur la faune sauvage (BLANCOU & PASTERET ,1988).

Certes, il s'agit d'un continent où sévit actuellement une épidémie de rage sylvatique, dont le principal vecteur est le renard roux, mais des situations similaires existent en Afrique du Sud (rage des mangoustes jaunes), en Amérique du Nord (rage des mouffettes et des rats laveurs) ou en Amérique Centrale et du Sud (rage des chauves-souris hématophages). «Vecteur» désigne ici l'espèce animale la plus sensible au virus rabique dans une région et à une période données, et la seule capable d'assurer la pérennité de l'infection. Toutes les autres espèces ne sont que des victimes (BLANCOU & PASTERET ,1988).

La rage des animaux domestiques malgré toutes les mesures prises a son égard et y compris la participation des propriétaires ne peut, de toute façon, arrêter le cycle de la rage, celle des animaux sauvages posait un problème plus ardu, ce sont jusqu'à présent eux qui paient le plus lourd tribut à la maladie et, jusqu'en 1960 la seule alternative possible semblait être la réduction des populations des espèces animales vectrices.

C'est incontestablement en Europe que la méthode de vaccination antirabique des animaux sauvages a connu son plus grand développement.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), dès les années 1970, décida de soutenir, d'organiser et de coordonner les efforts des équipes scientifiques étudiant cette méthode (BLANCOU & PASTERET ,1988).

A ce jour, la vaccination antirabique est obligatoire vu l'importance de la maladie tant sur le plan médical cas de rage humaine toujours mortelles lorsqu'elle est cliniquement déclarée qu'économiquement, par les pertes importantes qu'elle peut engendrer dans les cheptels touchés. Même si celle-ci est évitable à 100%, chaque année dans le monde, plus d'un million de personnes sont mordues par des animaux enrégés ou suspects et subissent-le

« Traitement » antirabique (vaccination après morsure); plusieurs milliers de personnes meurent de cette maladie, en l'absence de « traitement » ou, parfois, malgré le « traitement ».

La vaccination, avant exposition des populations à risque (vétérinaires, gardes chasse, animalier, personnel de laboratoire...) constitue la meilleure protection connue à ce jour.

La vaccination antirabique permet :

- une protection directe : une immunité post vaccinale, avant contamination, avec la présence d'anti corps neutralisants. un titrage suffisant et permanent qui est particulièrement important pour limiter, voire bloquer, la réplication du virus au point d'inoculation en cas de contamination.
- La protection indirecte : protection du sujet à qui, la personne vaccinée pourrait transmettre la maladie (action sur le réservoir).
- L'éradication: protection de la population mondiale.

De ce fait, la vaccination antirabique, quelque soit le type de vaccin ou le mode d'administration, permet de réduire l'incidence de la rage humaine et animale.

C'est un geste solidaire qui évite la propagation de la maladie et protège les populations.

IV. LES VACCINS ANTIRABIQUE

IV.1. Définition d'un vaccin

C'est un produit qui induit, dans un organisme hôte, une réponse immunitaire spécifique contre une pathologie infectieuse, parasitaire ou tumorale. Un vaccin doit assurer la production d'un taux élevé et durable d'anticorps protecteurs, de lymphocytes T cytotoxiques et d'une mémoire immunitaire mais aussi être sûr, facile d'emploi, de faible coût et le moins allergisant possible.

IV.2. Composition d'un vaccin

IV.2.1. Antigènes vaccinaux

Les antigènes vaccinaux correspondent au virus vivant atténué, inactivé ou l'antigène purifié qui induit la réponse immunitaire.

IV.2.2. Adjuvant

C'est une substance qui augmente l'immunogénicité et assure une longue durée de protection, en gardant l'antigène le plus longtemps possible sur le site de l'injection. Il peut induire secondairement une réaction allergique chez certains individus. Exemple : le sel d'aluminium permet d'augmenter l'efficacité des vaccins inactivés. Autre adjuvants : ASO42 et le squalène.

IV.2.3. Résidus de processus de fabrication

La fabrication d'un antigène ou d'un virus vivant atténué ou d'un virus inactivé, implique des passages sur cultures cellulaires ou encore l'utilisation d'œufs embryonnés. Des résidus peuvent éventuellement se retrouver en faible quantité dans le vaccin final et provoquer des réactions allergiques.

IV.2.4. Les conservateurs

Ce sont des produits qui évitent le développement de bactéries et de champignons susceptibles de détériorer le vaccin avant son utilisation et présentant un danger pour la santé de l'animal. Exemple : le Thiomersal (contient du mercure).

IV.2.5. Les contaminants

Un vaccin doit être dépourvu de tout contaminant microbien. Un seuil maximal de résidus toxiques est néanmoins autorisé.

IV.2.6. Le milieu liquide

Il doit être stérile et varie selon le procédé de fabrication du vaccin. Exemple : eau de PPI, sérum physiologique, solution tampon

IV.1.3. Les différents types de vaccins

IV.1.3.1. Vaccins à agent vivant

Vaccins à agent vivant atténué : le virus conserve ses propriétés d'antigénicité et d'immunogénicité. Ces souches présentent comme inconvénient une réversion de virulence

possible. Exemple : la souche FLURY est la souche du virus vivant atténué et cela par passage sur œufs embryonnés de poules, dans laquelle on distingue :

- La variété LEP (Low Egg Passage) a été obtenue après 136 passages, sur des poussins d'un jour.
- la HEP (High Egg Passage) après 2505 passages, sur des poussins d'un jour. (RABIES, 2009)

Avantages :

- Il induit une immunité similaire à celle obtenue après infection par le virus sauvage, elle est plus rapide et plus durable que celle obtenue avec le vaccin inactivé.
- La réplication de l'agent dans l'hôte permettant une induction d'une immunité à médiation cellulaire et humorale est obtenue après une injection de primo-vaccination
- Le coût de production est faible et les effets secondaires négligeables.

Inconvénients :

- Une virulence résiduelle est possible due à une technique de production inadaptée.
- Virulence de la souche par mutation au niveau de l'hôte ; persistance possible.
- Contamination par d'autres agents (bactéries, virus.)
- Utilisation déconseillée chez les animaux en immunodépression, les jeunes de moins de quatre semaines ou bien les femelles gestantes. (LEPRÊTRE, 2008)

Vaccins à agents vivants modifiés par génie-génétique : Le gène de la pathogénicité après identification est modifié par mutagenèse pour donner une souche virale non pathogène, avec un risque de réversion plus faible. Les anticorps vaccinaux peuvent être différenciés des anticorps post infectieux.

Vaccins à agent vivants vectorisés: Le gène pathogène responsable de l'induction de la réponse immunitaire est délaité et intégré à un organisme vecteur tel qu'une bactérie ou un virus (LEPRÊTRE, 2008).

IV.1.3.2. Vaccins immunisant à ADN

Le fragment d'ADN qui induit la réponse immunitaire est inséré à un plasmide bactérien qui sera par la suite injecté dans l'organisme hôte par IM.

La cellule hôte va par la suite exprimer la ou les protéines vaccinales, par transcription en ARNm et traduction des protéines endogènes qui seront par la suite présentées sur les molécules de CMH I et induiront une réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale.

Ce plasmide reste présent dans la cellule hôte sans pour autant se répliquer et assure par conséquent une immunité durable. De plus les protéines immunogènes ne sont pas neutralisées par les anticorps maternels car ils sont produits dans la cellule hôte ce qui rend possible la vaccination des jeunes sujets. (LEPRÊTRE, 2008)

IV.1.3.3 .Vaccins à agents inertes

Agents inactivés : l'agent infectieux est inactivé par différents procédés physiques et chimiques comme : la réticulation par le formaldéhyde, l'alkylation par la bétapropionolactone... Ces procédés ont pour finalité d'empêcher le virus de se répliquer dans l'organisme hôte tout en gardant ses propriétés immunogéniques.

Les adjuvants sont indispensables dans ce cas aux vaccins à agent inerte car ils potentialisent la réaction immunitaire.

Avantages :

- Pas de risque de virulence résiduelle ni de réversion de virulence
- Peut être utilisé chez les femelles en gestation, les immunodéprimés et les nouveaux nés privés de colostrum.

Inconvénients :

- Deux injections de primo-vaccination de 3 à 6 semaines d'intervalle est nécessaire pour une protection de 6 mois à un an, période plus courte que celle nécessaire au vaccin vivant.
- Induit une immunité humorale uniquement. (LEPRÊTRE, 2008)

Vaccins sous unitaires. Les protéines inductrices de la réponse immunitaire sont obtenues par :

- Purification ou concentration des protéines immunogènes à partir de l'agent pathogène
- Par génie génétique, pour être ensuite insérées à un hôte récepteur.

Ces vaccins sont appelés : vaccins peptidiques synthétiques. L'adjuvant est indispensable dans ce cas également pour optimiser l'action de ce vaccin. (LEPRÊTRE, 2008)

IV.1.3.4. Vaccins homologues et hétérologues.

Vaccin homologue : Vaccins produits à partir de l'agent pathogène.

Vaccin hétérologue : vaccin produit à partir d'un agent proche de l'agent pathogène, qui possède des épitopes proches de ce dernier et qui permet de fabriquer des vaccins sans utiliser de souches hautement virulentes. (LEPRÊTRE, 2008)

IV.3. Mode d'administration

IV.3.1. Voie parentérale

La voie parentérale comprend deux voies possibles : l'injection sous cutanée ou intramusculaire.

La voie sous cutané est la plus largement utilisée car facile d'accès mais l'absorption du vaccin peut être diminué en cas d'injection dans le tissu graisseux (LODDO, 2008). La souche Flury et Kelev sont les plus utilisées par voie parentérale.

IV.3.2. Voie orale

C'est la voie la plus utilisée pour l'espèce aviaire car pratique lors des vaccinations de groupe et permet une stimulation de l'immunité locale. Par contre, la dose d'antigène doit être plus élevée pour assurer un niveau d'immunisation égale aux autres voies.

La souche SAD adaptée de la variété ERA est celle utilisée pour la vaccination orale chez les animaux sauvages (RUPPRECHT *et al.*, 2004). Cependant la souche SAD présente un certain degré de pathogénie résiduelle pour les rongeurs sauvages (ARTOIS *et al.*, 1992) et une réponse immunitaire altérée chez les petits renards de moins de huit semaines d'âge.

V. PROTOCOLE DE VACCINATION

V.1. Age de la vaccination

En pratique l'âge de la vaccination antirabique est fixé à 3 mois pour les chiots nés de mère vaccinée ou pas. La vaccination avant cet âge est exclu (RABIES, 2009).

V.2. Conservation des vaccins

La conservation des vaccins est basée, sur le respect de la chaîne de froid, laquelle par définition, désigne l'ensemble du matériels, équipements et méthodes utilisés pour la conservation des vaccins qui se fait à une température de 2 à 8°C et cela à partir de leur fabrication jusqu'au moment de leur administration. (TOMA, 2006).

Importance de la chaîne de froid :

Les vaccins sont des produits très sensibles aux différents facteurs externes. Leur efficacité est quasiment nulle après une exposition :

- aux rayons du soleil.
- à un éclairage fluorescent
- à la chaleur et au froid c'est-à-dire : des températures inférieures à 2°C et supérieures à 8°C.

Cette exposition, peut entrainer une réponse immunitaire très faible et des réactions locales très prononcées.

Classification des vaccins mal conservés :

- **Vaccins exposés** : Ce sont des vaccins qui ont été conservés où manipulés à des températures trop basses ou au contraire trop élevées quelle que soit la durée.
- **Vaccins détériorés** : Ce sont des vaccins inutilisables pour cause de mauvaise conservation.
- **Vaccins perdus** : Ce sont des vaccins inutilisables jugés perdus par les services de la santé publique. exemple : vaccins détériorés ou périmés.

V.3. Mode de vaccination des différentes souches

V.3.1. Vaccin à virus vivant

V.3.1.1. FLURY

- **L.E.P.** : Chez les chiens de plus de 3 mois, en intramusculaire pour obtenir une meilleure immunité, avec un rappel annuel. L'immunité conférée dure 3ans.
- **H.E.P.** : utilisé chez le chien, le chat et les bovins en intramusculaire et procure une immunité d'une année.

Il est rare que la souche LEP chez le chien et HEP chez le chat, provoque une rage mortelle.

V.3.1.2. KELEV

Peut être administré aux chiens de 3 mois d'âge et les bovins. En pratique ce vaccin est rarement utilisé.

V.3.1.3. ERA

Cette souche est utilisée chez les chiens, les chats, les bovins, les équidés et les petits ruminants. En intramusculaire, elle entraîne une immunité de 2, 3 et 4 ans respectivement chez le chat, le chien et les bovins

A noter, qu'en pratique bien que rare, la souche ERA pourrait éventuellement entraîner une rage mortelle chez le chat et plus rarement encore chez les bovins.

V.3.2. Vaccins à virus inactivé

Ce type de vaccin est indiqué pour tous les animaux sensibles à la rage.

V.3.2.1. Carnivores domestiques

La primo vaccination se fait à l'âge de 3mois avec une injection en intramusculaire ou en sous cutanée. Les vaccins non adjuvés requièrent deux injections à intervalle de 15 à 30 jours, contrairement aux vaccins adjuvés qui ne nécessitent qu'une seule injection. Un rappel annuel est préconisé dans les deux cas.

V.3.2.2. Les herbivores

La vaccination chez les ruminants débute à l'âge de 6 mois, avec un rappel annuel. (TOMA, 2006)

V.4. Les résultats de la vaccination

Une première immunité est installée au bout de 21 jours post vaccination, et va durer environ un an, puis va commencer à décroître. Un rappel à ce moment là, va relancer l'immunité et elle sera dite solide juste après le premier rappel de vaccination.

En France, une étude récente a montré que les chiens répondaient moins bien à la vaccination rabique que les chats (CLIQUET *et al.*, 2003) : après primo vaccination, 14,5% des chiens avaient un titre inférieur à 0,5 UI/ml (contre 2,6% chez les chats).

V.5. Les échecs de la vaccination

La vaccination antirabique peut être sujette à des échecs dont les conséquences peuvent être très graves étant donné la dangerosité de la pathologie. Les échecs vaccinaux ont plusieurs origines :

- Mauvais lot de vaccins : ce qui est relativement rare, car chaque lot doit être contrôlé avant sa mise sur le marché.
- Mauvaise conservation : un bon lot peut s'avérer insuffisamment immunogène, en raison d'une mauvaise conservation : rupture de la chaîne de froid, congélation...etc.
- Mauvaise utilisation : un bon lot, correctement conservé, peut donner des échecs de vaccination en cas de mauvaise utilisation :
- Vaccination d'animaux trop jeunes, animaux sous traitement immunodépresseur ou corticothérapie.
- Une seule injection pour les vaccins non adjuvés, ou deux injections à quelques jours d'intervalle.
- Faux échecs : vaccination d'un chien en incubation de rage.

V.6. Effets secondaires des vaccins :

Tous les vaccins ont des effets secondaires plus ou moins graves ; certains sont normaux tels:

- Une légère hyperthermie ; un abattement de courte durée.
- Les effets à long terme sont beaucoup moins connus telles:
- Des réactions inflammatoires ; des maladies auto-immunes (allergie, artérites.etc.) ; induction de la pathologie.

V.7. Les vaccins disponibles actuellement sur le marché :

Tableau 1 : Les vaccins disponibles actuellement sur le marché algérien

Nom du vaccin	Composition	Indication	Administration	Protocole	Laboratoire
Nobivac RAGE Type : inactivé.	souche Pasteur RIV: min 2,0 IU Adjuvant: phosphate d'aluminium	Eq, Bo, Ov CN, CT.	IM. IM,SC.	Primovac: Eq, Bo, Ov (âge > 6 m): 1 dose Eq, Bo, Ov (âge < 6 m): 2e dose après l'âge de 6 m Ca, Fe (âge > 3 m): 1 dose Ca, Fe (âge < 3 m): 2e dose après l'âge de 3 m. Revac: Eq, Bo: 1 dose/2 ans Ov: 1 dose/an Ca, Fe: 1 dose/3 ans	Intervet
RABDO MUN Type : Inactivé.	Flury LEP: min 1,0I E/ml	Bv,Ct, CN.	SC.	Primovac: Bo, Ca, Fe (âge > 7 sem) dose/animal si primovac à un âge < 12 sem: rappel à l'âge de 12 sem Revac:	Pfizer A.H.

				tous les 3 ans (Bo, Ca), tous les 4 ans (Fe)	
RABISIN Type : Inactivé.	10exp 7 DL50/ml Adjuv: hydroxide d'aluminium	Eq, Bo, Ov, Cn,Ct.	IM,SC.	<p>Primovac:</p> <p>*vac à l'âge de 2 m min</p> <p>1ère revac après 1 an</p> <p>*vac à l'âge de 4 - 6 m min</p> <p>1ère revac après 1 an (Eq, Bo), 3 ans (Ov)</p> <p>Revac: tous les ans (Eq), tous les 2 ans (Bo), tous les 3 ans (Ov)</p> <p>Ca, Fe:</p> <p>*vac à l'âge de 4 sem min</p> <p>1ère revac après 6 m</p> <p>*vac à l'âge de 3 m min</p> <p>1ère revac après 3 ans</p> <p>Revac: tous les 3 ans</p>	Merial

Rabysiva Type : Inactivé.	Virus 1 U.I. Aluminium (s.f. d'hydroxyde) 2 mg	Cn, Ct, Eq, Bv, Cp, Ov.	IM,SC	<p>Cn, Ct:Primovac < 3 mois : 1 seule injection</p> <p>Éq : Primovac <6 mois : 1 seule injection.</p> <p>>6 mois : 2 injections à un mois d'intervalle.</p> <p>-Sujets issus de mères non vaccinées : à partir de deux mois d'âge.</p> <p>- Sujets issus de mères vaccinées : à partir de quatre mois d'âge.</p> <p>• Bv, ov, cp Primovac <9 mois: 1 injection.</p> <p>>9 mois: 1 injection à 4 m</p> <p>Rappel annuel.</p>	MERIAL
Vetera. Type : vivant attenué.	Non adjuvé	Cn,Ct, Bv, Eq,Ov.	IM	A 4mois d'age avec rappel annuel	Institut Pasteur Algérie.

VI. LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'EVALUATION DU VACCIN ANTIRABIQUE

Selon l'OMS la qualité du vaccin doit être contrôlé à deux niveaux: par le fabricant, mais aussi par un organisme officiel de contrôle. Le contrôle des vaccins antirabiques et de l'immunité qu'ils confèrent est probablement, une fois résolu celui de leur production, le problème le plus important posé en matière de prophylaxie de la rage. C'est en effet de l'efficacité de ce contrôle que dépendra le succès de l'éradication de la maladie.

Nous envisagerons successivement les techniques actuelles de contrôle des vaccins et de l'immunité antirabique, qui s'effectue de façon différentes selon qu'il s'agit d'un vaccin à virus inactivé ou vivant atténué. Les contrôles se font sur deux volets : sur le produit fini, et sur les espèces cibles.

VI.1. Contrôle sur le produit fini

Selon le type de vaccin le type de test utilisé change. Le vaccin à virus inactivé doit être soumis à deux tests :

L'injection intracérébrale à la souris et en intramusculaire à deux animaux au moins de l'espèce cible, du vaccin est nécessaire à la vérification de l'innocuité de ce dernier.

VI.1.1. Test de HABEL

- ***Principe:***

Consiste à éprouver des souris, vaccinées ou non, avec des doses croissantes de virus et à quantifier l'écart de la dose létale 50 % existant entre l'un et l'autre groupe .cet écart devrait être au minimum de 1 à 1 000.

- ***Limites :***

Ce test est en voie d'être abandonné du fait de son imprécision pour les vaccins de valeur « moyenne », et des difficultés de sa standardisation au niveau européen et qui a été largement remplacé par le test NIH (BLANCO, 1985).

VI.1.2. Le test National Institutes of Health (NIH)

- **Principe :**

Consiste à éprouver, avec une même dose de virus, des souris ayant reçu deux injections intra-péritonéales des diverses dilutions du vaccin à tester. L'efficacité du vaccin est quantifiée par sa dilution finale encore protectrice à 50 %.

- **Avantages :**

Les doses pourront être exprimées en unités internationales grâce à l'emploi simultané d'une préparation de référence internationale ou de son sous-étalon. C'est pourquoi le test de la pharmacopée Européenne utilise le même principe, mais avec une seule injection de vaccin.

Pour ces deux derniers tests, la valeur antigénique minimale requise par l'OMS est de 0,5UI/dose. Pour les transferts internationaux d'animaux, elle est de 1 UI/dose au minimum (OMS-OIE).

Les vaccins à virus « vivant » Flury, ERA sont soumis eux aussi à deux contrôles spécifiques: Leur innocuité peut être vérifiée par inoculation musculaire à au moins 20 cobayes et 2 animaux de l'espèce la plus réceptive à laquelle est destiné le vaccin.

Leur efficacité est vérifiée par la détermination du titre du virus-vaccin, et par l'inoculation musculaire à au moins 10 cobayes dont 70 % doivent résister à l'épreuve virulente alors que 80 % des témoins meurent.

Les vaccins à virulence résiduelle sont soumis à un simple titrage de virulence (qui ne doit pas excéder 10² DL50 i.c./souris) et éventuellement à des tests d'efficacité sur animaux de laboratoire ou espèce cible. (BLANCOU, 1985).

VI.2. Le contrôle sur l'animal de l'espèce cible.

Chez l'animal, l'immunité post-vaccinale peut être appréciée de façon directe ou indirecte.

VI.2.1. Le contrôle direct

C'est la comparaison de la résistance des sujets vaccinés aux sujets témoins, non vaccinés, à une épreuve de contamination qu'elle soit expérimentale ou naturelle. L'épreuve

expérimentale est la plus intéressante pour déterminer avec certitude la valeur et la durée de l'immunité que peut conférer un vaccin antirabique. Contrairement à la contamination naturelle qui est basée sur l'étude détaillée des cas de rage en zone d'enzootie, où les animaux sont ou ne sont pas vaccinés, elle permet de conclure le contrôle de manière statistiquement significative.

VI.2.2. Le contrôle indirect

Plus simple, moins couteux et pouvant être applicable à grande échelle. Il peut être réalisé par l'étude du sérum des animaux vaccinés (immunité humorale) ou par celle des réactions de l'immunité à médiation cellulaire.

L'étude de l'immunité humorale consiste à titrer les gammaglobulines sériques, soit d'après leurs propriétés neutralisantes, soit d'après diverses autres propriétés.

Les propriétés neutralisantes sont évaluées soit par inoculation à la souris (« séro-neutralisation sur souris », méthode actuelle de référence), soit par inoculation à des cultures cellulaires sensibles (« réduction du nombre de plages » ou « extinction rapide des foyers fluorescents »). Ces propriétés sont très bien corrélées, dans la majorité des cas, à la résistance des animaux à l'épreuve virulente. Elles peuvent être exprimées en unités internationales grâce au titrage simultané d'un sérum de référence de l'OMS.

Les autres propriétés sont évaluées par des techniques appropriées telles que la fixation du complément, l'hémagglutination passive, la contre immunoélectrophorèse, le titrage immuno-enzymatique, etc. (BLANCOU, 1985)

L'étude de l'immunité cellulaire, dont les résultats auraient pu logiquement compléter ceux de la mesure de l'immunité humorale, ne donne pas encore autant de satisfactions car paraissant mal corrélée à la résistance à l'épreuve.

Un des nouveaux tests de contrôle d'activité est un test immuno-enzymatique : ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

- **Principe :**

Technique permettant de visualiser une réaction antigène- anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps (IgG).

- **Avantages :**

- Les anticorps monoclonaux rendent la détection spécifique.
- Quantification possible grâce à la réalisation d'une gamme en parallèle.
- Les anticorps secondaires rendent la technique sensible.
- L'appareillage spécialisé n'est pas nécessaire à la détection du signal.
- Les trousseaux ont une validité d'une année environ.

- **Inconvénients :**

- La limite de détection est moins bonne que la technique RIA
- La réaction enzymatique rend cette technique dépendante de la température, du pH et de l'éclairement.

Partie
Expérimentale

I. OBJECTIF

Notre expérimentation a pour objectif de déterminer le statut vaccinal d'un effectif canin de 39 chiens de la wilaya d'Alger, vaccinés avec les différents types de vaccins commercialisés en Algérie à savoir :

- VETERA ; Institut Pasteur Algérie.
- RABISYVA ; Merial.
- RABISIN. Merial.
- NOBIVAC RAGE ; Intervet

Les titres d'anticorps antirabique ont été évalués par ELISA grâce à un kit commercial.

II. MATERIELS & METHODES :

II.1. Animaux étudiés, durée et lieux de l'expérimentation.

L'étude a porté sur un lot de 39 chiens, âgés de 5 mois à 12 ans. Ces chiens ont été recrutés de manière aléatoire à la consultation de la clinique canine de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire (ENSV) sur une période s'étalant de janvier à mai 2011.

Les prélèvements ont été effectués sur des chiens de sexe, de race et d'âges différents et ont été analysés au niveau du laboratoire de Biochimie de l'ENSV et la lecture des densités optique a été effectuée au laboratoire de l'Institut National de Médecine Vétérinaire (INMV).

II.2. Nature du prélèvement

Un prélèvement de 4 ml de sang a été effectué au niveau de la veine brachiocéphalique après la pose d'un garrot et une asepsie rigoureuse.



Figure 5 : Méthode de prélèvement sanguin.

Les prélèvements, ont été réalisés sur tube sec avec activateur de coagulation, conservés à une température de +4°C avant d'être acheminés au laboratoire pour y être centrifugés à 3°000 tours/min pendant 5minutes. Pour chaque prélèvement, le sérum est séparé du culot, répartis dans deux microtubes et conservés à -20°C.



Figure 6 : Prélèvements sanguins après centrifugation.

II.3.Equipements et consommables utilisés.

CONSOMMABLES

- Vacuette 04ml. serum culot activator. Greiner bio-one.
- Seringue, de 5ml Ultralisse, IMC.
- Coton hydrophile purifié.
- Alcool chirurgical à 70°.
- Ependorfs de 0,5 à 1,5ml.
- Tubes coniques de centrifugation.
- Papier alluminium.
- Papier watman.
- Papier sopalin.
- Eau distillée.
- Gants en latex.
- Tubes sec.
- Cones pour micropipette.

EQUIPEMENTS.

- Centrifugeuse, Selecta.
- Micro-pipette de 100 à 1000 µl.
- Transferpette de 10 à 100µl.
- Incubateur "JOUAN".
- Lecteur de microplaque "BDSN Immunoskan.", Filtre de 450 à650nm.
- Transcrieur de resultats "EPSON" LX-300.
- Melangeur Vortex^R.

II.4. Trousse PALETETIA™ RABIES II

Nous avons utilisé pour notre partie expérimentale la trousse PALETETIA™ RABIES II qui est un test ELISA de diagnostic *in vitro* permettant la détection et le titrage des IgG anti-glycoprotéine du virus rabique dans le sérum animal (chien, chat, renard), certifié par l'OIE.



Figure7 : Trousse PALETETIA™ RABIES II.

II.4.1. Composition du kit

Tableau 2 : Les composants du kit ELISA (Trousse PALETETIA™ RABIES II)

ETIQUETAGE	NATURE DES REACTIFS
R1	Microplaque : 12 barrettes de 8 puits sensibilises avec la glycoprotéine du virus rabique
R2	Solution de lavage : concentre 10 fois, Tampon Tris-NaCl Conservateur : ProClin™ 300 (0,01%)
R3	Contrôle négatif : contrôle non réactif Tris-EDTA Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)
R4a	Contrôle Positif 0,5 EU/ml : contrôle positif calibre a 0.5 EU/ml Tampon glycine contenant de la BSA et du sérum canin avec des IgG anti-rabiques. Couleur jaune Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)
R4b	Contrôle Positif 4 EU/ml : contrôle positif calibre a 4 EU/ml

	Tampon glycine contenant de la BSA et du sérum canin avec des IgG anti-rabiques. Couleur bleue Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)
R6	Diluant échantillons : Tampon TRIS - EDTA prêt-à-l'emploi Couleur rouge. Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)
R7	Conjugué : Tampon PBS contenant Protéine A - Peroxydase, protéine bovine purifiée. Concentre 10 fois. Couleur verte. Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)
R8	Tampon substrat de la peroxydase : Solution d'acide citrique et d'acétate de sodium contenant 0,015% de H ₂ O ₂ et 4% de dimethylsulfoxyde (DMSO)
R9	Chromogène : Solution de tetramethylbenzidine (TMB) 0,25%
R10	Solution d'arrêt : Acide sulfurique 1 N
	Films adhésifs pour microplaques

II.4.2.Préparation des réactifs.

Avant utilisation, nous avons laissé les réactifs et la microplaque revenir à température ambiante (+18°C) pendant 30 minutes ; on a homogénéisé les réactifs avant ouverture.

Réactifs prêts à l'emploi :

- Microplaque (**R1**)
- Diluant échantillon (**R6**)
- Solution d'arrêt (**R10**)

Réactifs à reconstituer :

- **Solution de lavage (R2) :** On a dilué 50ml de solution de lavage R2 dans 450ml d'eau distillée soit une dilution au 1 /10^e
- **Contrôle négatif (R3) :** On a dilué la solution au 1/100e dans le réactif R6.
- **Contrôle positif 0.5 EU/ml (R4a) :** On a dilué le contrôle positif R4a au 1/100 e dans le réactif R6.

- **Contrôle positif 4 EU/ml (R4b)** : On a dilué le contrôle positif R4b au 1/100 e dans le réactif R6.

- **Conjugué (R7)** : On a dilué 1,1ml du réactif R7 dans 9,9ml de solution de lavage fraîchement reconstituée (une dilution au 1 /10^e) pour obtenir 11ml de solution suffisante pour une microplaque.

- **Solution de développement enzymatique (R8 + R9)** : On a diluée 1ml du réactif R9 dans 10ml de réactif R8 soit une dilution de 1/11^e pour obtenir une solution de révélation enzymatique de 11ml suffisante pour une microplaque.

Nous avons homogénéisé délicatement chaque dilution sans utilisation d'un votex^R.

II.4.3. Préparation de la gamme de quantification pour un test quantitatif :

Chaque test quantitatif utilisant le kit **PLATELIA™ RABIES II** comporte 6 standards de quantification de **S1** à **S6**.

Le contrôle positif R4b (calibré à 4EU/ml) correspond au standard de quantification S6. Les dilutions en série du réactif R4b permettent la préparation des standards de quantification S5 à S1. Les dilutions sont effectuées avec le diluant échantillons (réactif R6).

Tableau 3 : Préparation de la gamme de quantification pour un test quantitatif

Standards de Quantification		Concentrations obtenues par dilutions du contrôle positif R4b
S6	R4b dilué au 1/100e	4 EU/ml
S5	S6 dilué au 1/2	2 EU/ml
S4	S5 dilué au 1/2	1 EU/ml
S3	S4 dilué au 1/2	0,5 EU/ml
S2	S3 dilué au 1/2	0,25 EU/ml
S1	S2 dilué au 1/2	0,125 EU/ml



Figure 8 : Réactifs utilisés.

II.4.4. Echantillon

Après la collecte de 39 sérums de chien, sur une période de 5 mois, il a été procédé à leur congélation à une température de -20°C , puis retirés pour décongélation 12 heures avant analyse et conservés à une température de $+2^{\circ}\text{C}$.

Le transport a été effectué à l'aide d'une glacière à $+4^{\circ}\text{C}$ et ils ont été mis à température ambiante juste avant leur dilution dans le réactif R6 au 1/100.



Figure 9 : Microtubes contenant les différents sérums.

II.4.5. Description de la technique

1. Sortie de la microplaque son emballage.
2. Préparation du plan de distribution des échantillons pour la méthode quantitative sur papier wattman.

Tableau 4 : Plan de distribution pour la methode quantitative

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S4	001a	001b	009a	009b	017a	017b	025a	025b	033a	033b
B	R3	S4	002a	002b	010a	010b	018a	018b	026a	026b	034a	034b
C	R4a	S3	003a	003b	011a	011b	019a	019b	027a	027b	035a	035b
D	R4a	S3	004a	004b	012a	012b	020a	020b	028a	028b	036a	036b
E	S6	S2	005a	005b	013a	013b	021a	021b	029a	029b	037a	037b
F	S6	S2	006a	006b	014a	014b	022a	022b	030a	030b	038a	038b
G	S5	S1	007a	007b	015a	015b	023a	023b	031a	031b	039a	039b
H	S5	S1	008a	008b	016a	016b	024a	024b	032a	032b	040a	040b

3. On a préparé la gamme de quantification et dilution des contrôles négatif R3 et positif R4a ainsi que les échantillons à tester au 1/100^e dans le réactif R6. Soit 10µl d'échantillon dans 990µl de solution de dilution.
4. On a distribué de 100µl de contrôle négatif et positif de standard de quantification et des échantillons dilués dans les puits correspondant en suivant le plan de distribution pré établie.



Figure 10 : Microplaque après ajout des différents réactifs et des sérums.

5. On a recouvert d'un film adhésif et pressé fermement afin d'assurer un scellage hermétique.
6. Incubation à 37°C pendant 60minutes.



Figure 11 : Incubation de la microplaque.

7. Nous avons préparé la solution de lavage R2
8. Préparation de la solution de conjugué R7 avant la fin de la première incubation.
9. Retrait du film adhésif, nous avons procédé à 3 cycles de lavage par la micropipette multiple, puis séché par retournement sur papier absorbant, entre chaque cycle de lavage.
10. Distribution de 100µl de solution conjuguais R7 dans chaque puits et recouvrir avec un nouveau film adhésif. Passage à l'incubateur à 37°C pendant 60minutes.



Figure 12 :Microplaque après ajout du conjuguais R7.

11. Préparation de la solution de révélation enzymatique R8+R9 juste avant l'utilisation.

Dans un tube de Falcon protégé par un papier aluminium à l'abri de la lumière.

12. Après retrait du film adhésif, on a effectué 5 cycles de lavage avec séchage par retournement sur papier absorbant entre chaque cycle et cela en moins de 5 minutes.

13. A l'abri de la lumière directe, on a distribué rapidement 100µl de solution de révélation (R8+R9) dans chaque puits et incubé la microplaque recouverte d'un papier aluminium pendant 30 minutes à température ambiante. (+18°C à +30°C).



Figure 13 : Protection de la microplaque à l'abri de la lumière.

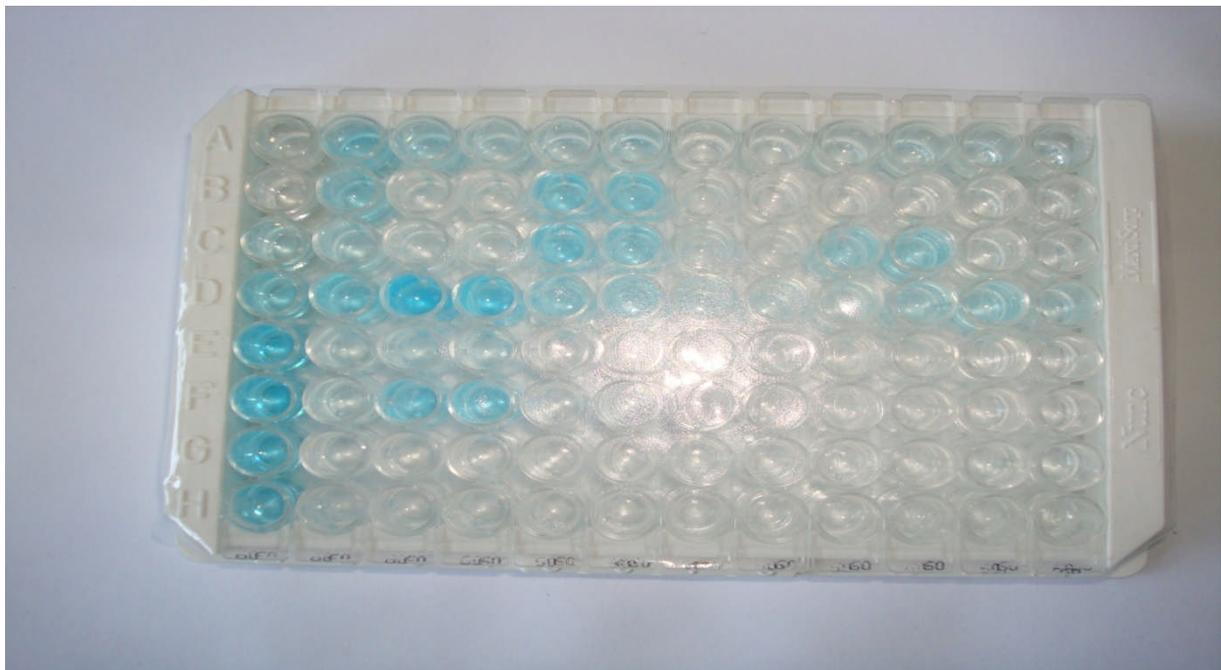


Figure 14 : Microplaque après incubation à température ambiante.

14. L'ajout de 100 μ l de solution d'arrêt R10 dans chaque puits dans le même ordre avec même rythme que pour la solution de révélation.



Figure 15 : Préparation de la solution d'arrêt

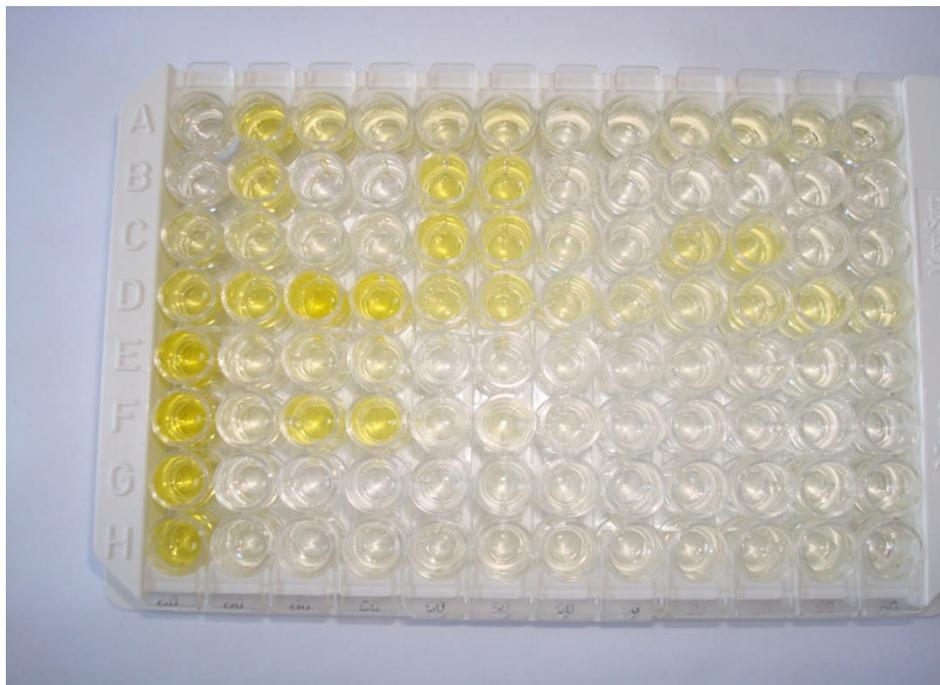


Figure 16 : Microplaque après ajout de la solution d'arrêt.

15. L'acheminement de notre microplaque au niveau du laboratoire d'analyse de l'institut national de la médecine vétérinaire pour une lecture des résultats.
16. Après avoir sorti la microplaque du papier protecteur et le retrait du film adhésif, on a essuyé soigneusement le dessous de la plaque. La lecture des densités optique en biochromatisme a été faite à un filtre de 450-620 nm.

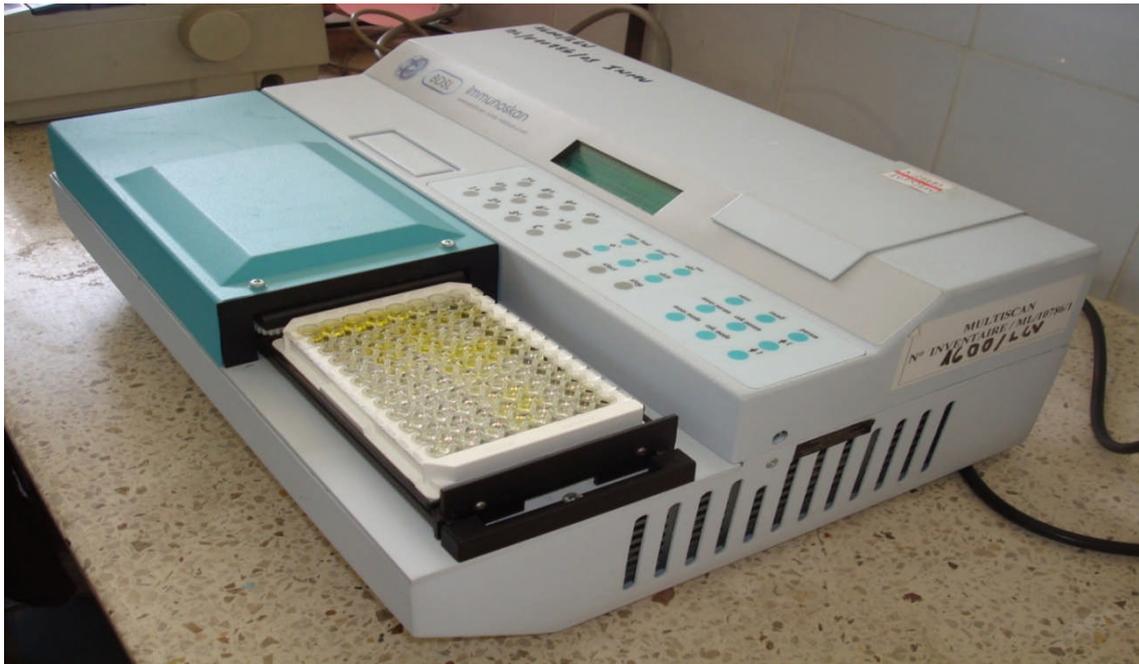


Figure 17 : Lecteur de microplaque "BDSN Immuniskan.", Filtre de 450 à 650nm.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

La rage est une pathologie inscrite dans la liste des zoonoses les plus meurtrières de l'OIE qui touche aussi bien l'homme que les animaux. Ces derniers sont considérés comme les principales sources de contamination. La stratégie de lutte contre la rage implique une éradication des animaux errants et la mise en œuvre d'une vaccination animale la plus large possible.

Depuis le 3 juillet 2004 la réglementation européenne appliquée pour les transports internationaux des carnivores domestiques entre les pays infectés et les pays indemnes exige un taux d'anticorps neutralisant d'au moins 0,5UI/ml.

Dans notre étude une analyse quantitative des taux d'anticorps vaccinaux d'un effectif de 39 chiens a été réalisée afin de déterminer leur statut vaccinal.

Notre effectif a été scindé en deux catégories de chiens, la première catégorie « A » comporte des chiens prélevés au niveau de la clinique canine de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, qui sont des chiens vaccinés avec les différents vaccins commercialisés Algérie.

La seconde catégorie « B » concerne des chiens de chasse au statut vaccinal inconnu dit vaccinés mais sans présentation de carnets.

L'analyse des sérums a montré que seulement 9 chiens sur 39 ont présentés un taux d'anticorps supérieur ou égal à 0.5UI/ml. Soit un pourcentage de 23.07% de chiens réellement immunisés contre la rage.

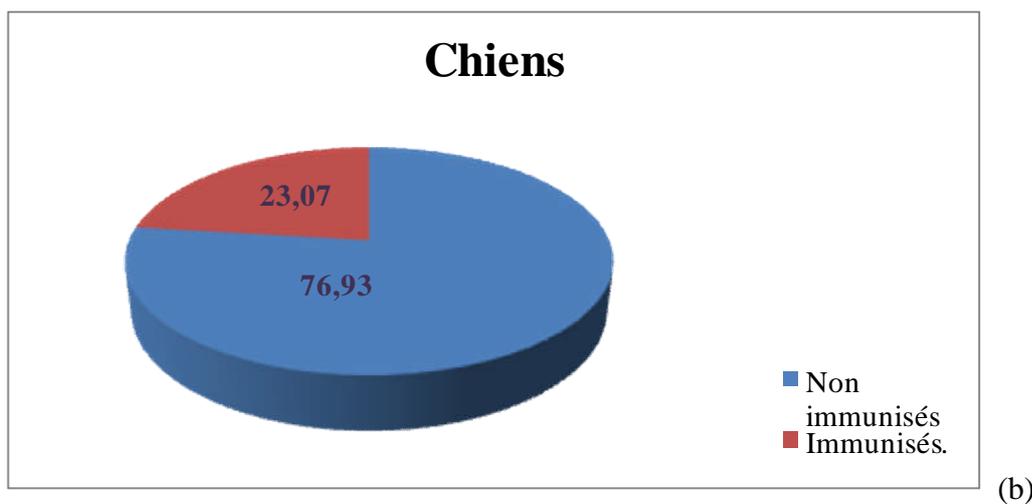
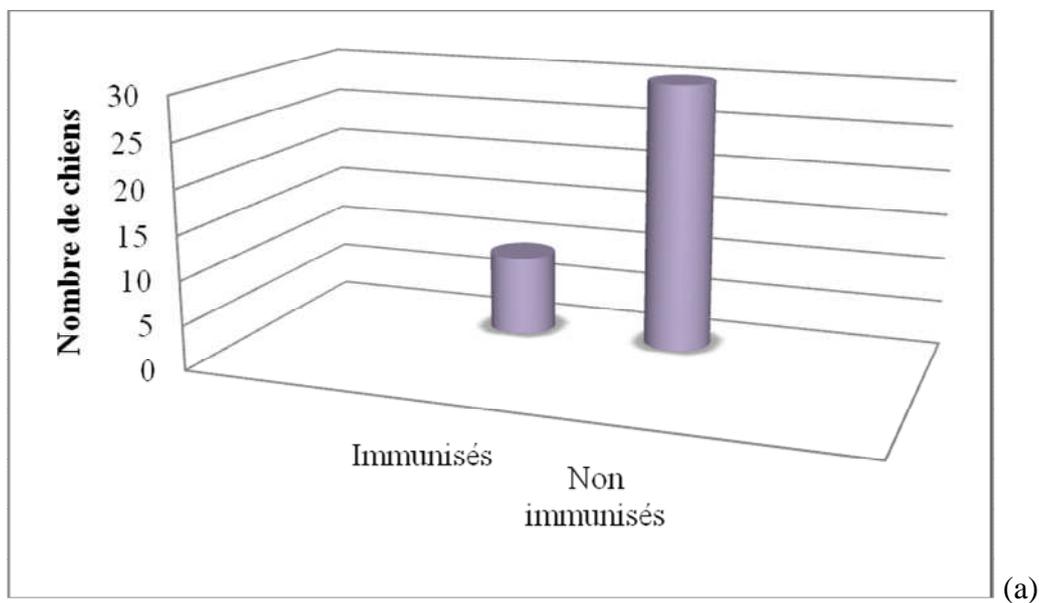


Figure18 : Pourcentage des chiens immunisés et non immunisés.

❖ **Catégorie A :**

Les chiens vaccinés avec différents types de vaccins. Sur un effectif de 19 chiens, seulement 6 ont présentés un taux d'anti corps supérieur ou égal à 0.5UI/ml. Soit un pourcentage de 31.57% de chiens immunisés.

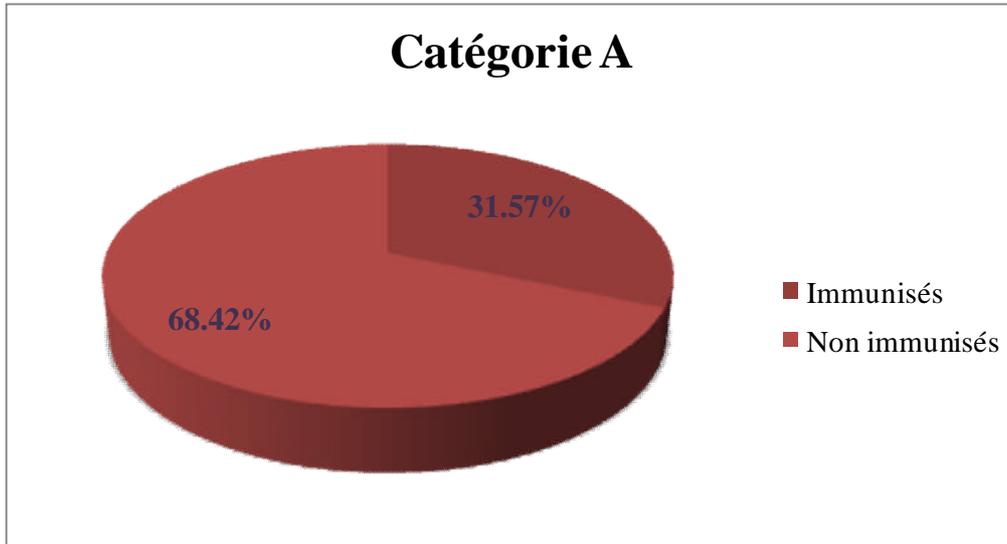


Figure 19 : Pourcentage de chiens immunisés de la catégorie « A ».

Tableau 5 : Effectif total des chiens immunisés et non immunisés selon le type de vaccin

	Effectif total	Immunisés	Non immunisés
Rabisyva	14	2	12
Vetera	2	2	0
Rabisin	1	1	0
Nobivac rage	1	0	1

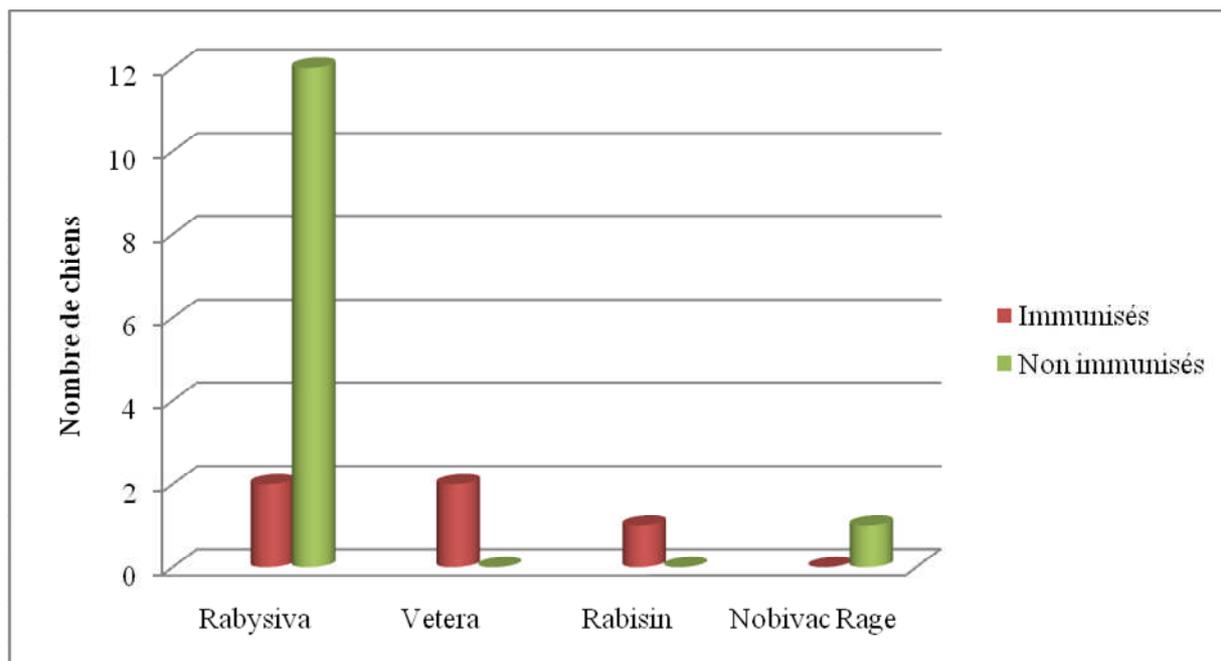


Figure 20: Nombre de chiens immunisés et non immunisés selon le type de vaccin.

Les échecs vaccinaux constatés pourraient être dus à :

- L'inactivation du vaccin (utilisation d'alcool pour l'asepsie avant la vaccination avec les vaccins vivants atténués, mauvaise conservation du vaccin, rupture de la chaîne de froid)
- L'état de l'animal le jour de la vaccination (immunodépression, gestation, mise bas...etc....).
- Une vaccination récente ou une courbe d'anticorps en phase de décroissance

❖ La catégorie B :

Pour les chiens de cette catégorie sur les 19 chiens seulement 3 ont présenté un taux d'anticorps supérieur ou égal à 0,5UI/ml. Soit un pourcentage de 15.78% de chiens immunisés.

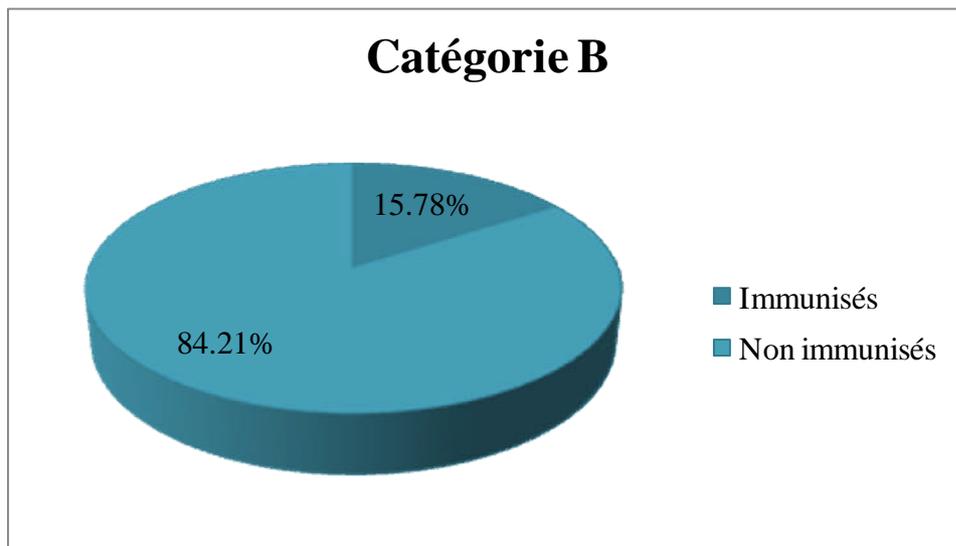


Figure 21: Pourcentage de sujets immunisés dans la catégorie « B ».

Ce faible taux pourrait être du :

- Une absence pure et simple de vaccination
- Une utilisation d'un vaccin provenant d'un lot périmé ou mal conservé.
- L'inactivation du vaccin au moment de son utilisation.
- Une vaccination non suivie d'un rappel.
- Une vaccination récente.

CONCLUSION

L'expérimentation que nous avons effectuée sur deux (02) lots de chiens nous a permis de relever, que quelque soit le statut vaccinal des 39 chiens recrutés, seule 09 ont présenté un taux d'anticorps antirabique suffisants pour conclure qu'ils étaient réellement immunisés contre la rage.

En effet, sur les 19 chiens composant le premier lot présentés en clinique canine de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, pour leurs rappels annuels, seulement 06 chiens avaient des taux d'anticorps suffisants.

Quant au deuxième lot de chiens prélevés sur le terrain, 19 au total, nous avons relevé que seulement 03 étaient immunisés sachant que ce deuxième lot de chiens est constamment exposé à un risque potentiel de rage car en contact étroit avec la faune sauvage vivants de surcroît dans une zone urbaine.

En dépit du fait que la vaccination antirabique est devenue obligatoire, les propriétaires des carnivores domestiques n'en tiennent guère compte et s'exposent à un risque infectieux majeur.

Les organisations mondiales (OMS, OIE) déploient des efforts intenses pour éradiquer cette maladie. Il devient donc impératif que ces efforts soient relayés par des actions visant à :

- Organiser de campagnes de vulgarisation et de sensibilisation par tous les supports médiatiques pour une meilleure prise de conscience des dangers de cette maladie.
- Promouvoir la vaccination gratuite pour toucher un large éventail de carnivores domestiques.
- Instaurer la vaccination obligatoire des chiens de chasse et de garde
- Favoriser la coopération entre les propriétaires, les éleveurs et les vétérinaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rage canine en Algérie impact sur la santé publique (mémoire du diplôme de post graduation spécialisée /options : pathologie canines).
- La RAGE par les Ecoles Nationales Vétérinaires Françaises / Maladies Infectieuses 2004.
- Importance de la vaccination.
- La rage / maladie contagieuse des écoles nationales vétérinaires Françaises.
- Relevé épidémiologique hebdomadaire OMS.
- La rage canine en Algérie impact sur la santé publique /Khazmat Hamza.
- Le vaccin antirabique.
- Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. La vaccination des carnivores domestiques en 2008.
- Rabies, édition 2009.
- Nouveaux concepts de vaccination.
- LA RAGE Professeur B. Toma.
- La rage canine en Algérie impact sur la santé publique. Khazmat Hamza.
- Situation de la rage dans le monde et en Algérie Abdi djaouida.
- Les vaccins et la vaccination antirabique des animaux domestiques et sauvages en Europe J. BLANCOU 1985 OIE.

ANNEXES

TABLEAU : taux d'anticorps des chiens de la catégorie « A ».

Numéros	Nom du chien	Taux d'anticorps
1	Max	0,338
2	Klaous	0,184
3	Rocky	3,486
4	Kindy	0,298
5	Tessay	1,6455
6	Roma	0,125
7	Stella	0,125
8	Alf	0,3465
9	Lysa	0,726
10	Beauty	1,338
11	Zaouali	0,476
12	Rex	0,7125
13	Stansky	0,2295
27	Pacot	0,327
28	René	0,1375
29	Mario	0,125
19	Lina	0,309
32	Brad	0,2745
33	Vano	0,1505
23	Vicky	0,142

TABLEAU2 : taux d'anticorps des chiens de la catégorie « B ».

Numéros	Nom du chien	Taux d'anticorps
14	Mitchou	0,1375
15	Poupousse	0,1435
16	Gillette	0,165
17	Toutou	2,0625
18	Vita	0,198
31	Belkhir	0,14
20	Loulou	0,8475
21	Bébé	0,1255
22	Lina	0,128
30	Djeloul	0,125
24	Rina	0,276
25	Gol	0,125
26	Tina	0,5825
34	Rex	0,179
35	Bekhhta	0,3685
36	M'hand	0,1555
37	beghlia	0,1255
38	Olisse	0,185
39	Rocky	0,1455

Plan de distribution des différents échantillons et résultats obtenus après analyse.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S4	01a	01b	09a	09b	17a	17b	25a	25b	33a	33b
B	R3	S4	02a	02b	10a	10b	18a	18b	26a	26b	34a	34b
C	R4a	S3	03a	03b	11a	11b	19a	19b	27a	27b	35a	35b
D	R4a	S3	04a	04b	12a	12b	20a	20b	28a	28b	36a	36b
E	S6	S2	05a	05b	13a	13b	21a	21b	29a	29b	37a	37b
F	S6	S2	06a	06b	14a	14b	22a	22b	30a	30b	38a	38b
G	S5	S1	07a	07b	15a	15b	23a	23b	31a	31b	39a	39b
H	S5	S1	08a	08b	16a	16b	24a	24b	32a	32b	40a	40b

Résumé :

La Rage est une pathologie qui existe depuis le Moyen âge et malgré la progression de la science elle continue à faire des ravages dans le monde. Seule une vaccination rigoureuse peut protéger les individus (homme et animal) de cette pathologie.

Le but de notre étude est de jeter toute la lumière sur la réalité de la vaccination antirabique canine en Algérie que ce soit pour les animaux correctement suivis par leurs propriétaires ou ceux qui sont négligés, en première ligne de contamination par les animaux sauvages.

Pour cela nous avons procédé à un titrage d'anticorps par une technique quantitative ELISA. Les résultats de notre étude sont alarmants et pour cause un nombre très faible de chiens sont immunisés contre la rage, que ce soit pour les animaux correctement suivis ou ceux qui ne le sont pas.

A l'issue de cette étude, nous ne pouvons que recommander une nouvelle vaccination de tous les chiens dit non immunisés, et un suivi plus rigoureux des protocoles vaccinaux, notamment pour la population en contact avec les animaux sauvages et vivants dans les zones urbaines.

Mots clé : Rage, Zoonose, vaccination, anticorps.

Summary:

Rabies is a disease that has existed since the Middle Ages, and despite the progress of science continues to wreak havoc in the world. Only a rigorous vaccination can protect people (man and animal) of this pathology.

The aim of our study is to shed full light on the reality of canine rabies vaccination in Algeria as it is for the animals properly monitored by their owners or those who are neglected, the first line of contamination by wild animals.

For this we conducted an antibody titration by quantitative ELISA technique. The results of our study are alarming and cause a very small number of dogs are vaccinated against rabies, either for animals properly followed or those who do not.

Following this study, we can only recommend a new vaccination of all dogs not immunized said, and closer monitoring of vaccination protocols, especially for people in contact with wild animals and live in urban areas.

ملخص

داء الكلب هو مرض الذي كان قائما منذ العصور الوسطى ، وعلى الرغم من التقدم العلمي لا تزال تعيث فسادا في العالم. فقط يمكن للتطعيم صارمة تحمي الناس (الإنسان والحيوان) من هذه الأمراض. الهدف من دراستنا هو تسليط الضوء على واقع التلقيح ضد داء الكلب الكلب في الجزائر كما هو الحال بالنسبة للحيوانات رصدها بشكل صحيح من قبل أصحابها أو أولئك الذين المهمل ، السطر الأول للتلوث من الحيوانات البرية.

الكمي. نتائج دراستنا هي مزعجة وتسبب يتم *ELISA* لهذا قمنا بإجراء معايرة الأجسام المضادة عن طريق تقنية تطعيم عدد قليل جدا من الكلاب ضد داء الكلب، إما لحيوانات اتبعت بشكل صحيح، أو أولئك الذين لا يفعلون ذلك بعد هذه الدراسة ، يمكن أن نوصي فقط لقاح جديد لجميع الكلاب لم يتم تحصينهم وقال، وتوثيق ورصد بروتوكولات التطعيم ، خصوصا بالنسبة الى اشخاص على اتصال مع الحيوانات البرية ويعيشون في المناطق الحضرية