

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire



Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Master

en

Médecine vétérinaire

THEME

Processus de la fabrication du sérum antirabique et résultats de titrage des anticorps par la technique RFFIT chez les équins à l'institut Pasteur d'Alger

Présenté par :

Melle BEN MANSOUR Cerine

Mr. BENTARZI Mohamed Amine

Soutenu publiquement, le 25 novembre 2020 devant le jury :

Mme MARNICHE.F

Professeur (ENSV)

Présidente

MmeBOUKHORS.K.T

Professeur (ENSV)

Examinatrice

Mr LAHOUASSA.H

MCA (ENSV)

Promoteur

Mr ISAAD.M

Directeur de la production à
l'institut Pasteur

Co-promoteur

Déclaration sur l'honneur

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

Signature

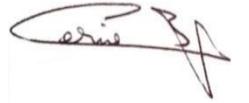
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bentarzi', with a stylized flourish extending from the end.

Déclaration sur l'honneur

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

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Signature



Remerciements

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

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

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

Nous souhaitons exprimer nos remerciements également envers nos encadreurs :

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

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

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

Nous tenons à remercier les membres du jury :

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

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

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

SOMMAIRE

Liste des Figures.....	
Liste des Tableaux.....	
Résumé	
Abstract.....	
Introduction.....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
GENERALITES SUR LA RAGE.....	2
1. Virus de la rage	2
Classification.....	2
Structure.....	2
Multiplication du virus.....	3
2. Épidémiologie	3
Source du virus.....	3
Cycle sylvatique et urbain.....	3
Mode de transmission du virus.....	4
3. Symptômes	4
Rage furieuse.....	5
Rage paralytique (ou muette).....	6
4. Diagnostic de la rage	6
Diagnostic chez les animaux.....	6
Diagnostic chez l'être humain	7
Diagnostic de laboratoire	7
5. Traitement et prévention	10
Vaccination préventive	10
Prophylaxie post-exposition.....	10
SEROTHERAPIE ANTIRABIQUE	12
1. Conformation et structure d'un Anticorps.....	12
2. Implication de la Glycoprotéine G.....	13
3. Anticorps polyclonaux	14
4. Anticorps monoclonaux	16
a. Production des Anticorps monoclonaux.....	16
b. Types d'anticorps à travers le temps	17
c. Anticorps monoclonaux utilisé dans la rage	18
PARTIE EXPERIMENTALE.....	

2. Matériels	19
3. Méthodes	21
a) Choix des animaux.....	21
b) Immunisation primaire.....	21
c) Immunisation secondaire.....	21
d) La plasmaphérese	22
e) Titrage du sérum antirabique récolté	23
f) Purification du sérum antirabique	24
4. Résultats	25
Discussion	30
Conclusion et perspective	34
Références bibliographique	

Liste des Figures

Figure 1 : Schéma représentatif du virus rabique en forme de balle de revolver.	2
Figure 2 : Cycle de transmission de la rage.....	3
Figure 3 : Un chien enragé avec de la salive dégoulinant de la bouche.....	5
Figure 4: Corps de Negri ; inclusions cytoplasmiques dans cellules de cerveau de chien, signe de l'infection.....	8
Figure 5: Micrographie révélant un résultat positif du a la présence d'antigène antirabique avec la technique d'immunofluorescence directe.....	9
Figure 6 : Configuration structural de l'anticorps	13
Figure 7 : Structure détaillée de la Glycoprotéine G en montrant les trois domaines antigéniques	14
Figure 8: Schéma représentant les étapes de fabrications des hybridomes dans le but de produire des anticorps monoclonaux	17
Figure 9: La plasmaphérèse reliée à une poche de collecte et un anticoagulant par des tubulures.....	20
Figure 10: Immunisation secondaire d'un cheval par le virus rabique (Souche LPS).....	22
Figure 11 : Processus de récolte de sérum chez un cheval par plasmaphérèse	23
Figure 12 : L'histogramme suivant montre les variations des titres d'anticorps antirabiques neutralisants	28
Figure 13: Sérum antirabique conditionnée et étiqueté produit à l'IPA	29

Liste des Tableaux

Tableau 1 : la prophylaxie post exposition recommandé selon la catégorie d'exposition.....	11
Tableau 2 : Les dilutions des sérums utilisés dans le présent travail.....	24
Tableau 3 : Observation et interprétation des résultats de RFFIT.....	26
Tableau 4 : Résultats des titrages d'anticorps antirabique par RFFIT en nombre de champs des 6 lots de sérum à expertiser produit à l'IPA.....	27
Tableau 5 : Résultats des titres d'anticorps antirabiques exprimés en UI/ml	28

Abréviations

- AC: Anticorps
- ARN: Acide ribonucléique
- PBS: Tampon phosphate salin
- BHK-21: Baby hamster kidney
- CA: Calcium
- CDR: Complementarity determining regions
- CEE-cELISA :cost-effective and easy competitive enzyme linked immunosorbent assay
- Cl₂: Chlore
- COVID: Corona virus disease
- CVS-11 : Challenge virus standard
- DE50 : Dose efficace à 50%
- DL50 : Dose létale a 50%
- DMEM :Dulnecco's modified eagle medium
- ERIG : Equin rabies immunoglobulins
- Fab : Fragment antigen-binding
- Fc : Fragment crystallizable
- HAT :Hypoxanthine, Aminoptérine et Thymidine
- HRIG :Human Rabies Immunoglobulins
- HBV : Hepatitis B virus
- HCV : Hepatitis C virus
- HIV: Human immunodeficiency virus
- HGPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase
- IG : Immunoglobuline
- IPA : institut pasteur d'Alger
- KDa : Kilo dalton
- LPS : Louis Pasteur Saigon
- N-CAM : Molécule d'adhésion des cellules neurales
- OMS : Organisation mondiale de la santé
- OIE : Office international des épizooties
- PPE : Prophylaxie post exposition
- P75NTR : Le récepteur de la neurotrophine P75
- RFFIT:Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test

- RIG : Rabies Immunoglobulins
- RT PCR : reverse transcription polymerase chain reaction
- RVGP : Glycoprotein rabies virus
- SCFV : Single-chain fragment variable
- TC : Témoin cellule
- TK: Thymidine kinase
- TV: Témoin virus
- UI: Unite international
- USD: united states dollar
- VR : virus rabique

Résumé

Malgré de grands progrès dans le décodage des mécanismes de la maladie, la rage reste l'une des principales causes de mortalité humaine dans le monde. La rage est entièrement évitable. Tous les décès sont le résultat d'un échec de la prophylaxie. La prise de conscience du risque de contact avec des animaux enragés est cruciale.

En vue de mettre en avant les travaux de l'institut pasteur d'Alger concernant la lutte contre la rage, cette étude comprend une description du processus de fabrication du sérum antirabique au sein de cet établissement afin de subvenir aux besoins de la population pour la prophylaxie post exposition.

Mot clé : rage-cheval-sérum-prophylaxie-RFFIT

Abstract

Despite great progress in decoding the mechanisms of the disease, rabies remains one of the main causes of human mortality in the world. Rabies is completely preventable. All deaths are the result of prophylaxis failure. Awareness of the risk of contact with rabid animals is crucial.

In order to highlight the work of the Pasteur Institute of Algiers concerning the fight against rabies, this study includes a description of the manufacturing process of the anti-rabies serum within this establishment in order to meet the needs of the population for the post-exposure prophylaxis.

Key words: rabies-horse-serum-prophylaxis-RFFIT

على الرغم من التقدم الكبير في فك شفرة آليات المرض، ال يزال داء الكلب أحد الأسباب الرئيسية لوفيات البشر في العالم. يمكن الوقاية من داء الكلب تما ما بجميع الوفيات نتيجة فشل العلاج الوقائي. يعد الوعي بخطر مالمسة الحيوانات المصابة بداء الكلب أم را بالغ الأهمية

من أجل تسليط الضوء على عمل معهد باستير بالجزائر العاصمة فيما يتعلق بمكافحة داء الكلب، تتضمن هذه الدراسة وصفا لعملية تصنيع المصل المضاد لداء الكلب داخل هذه المؤسسة من أجل تلبية احتياجات السكان من منع الوقاية بعد التعرض RFFIT-. الكلمات المفتاحية: داء الكلب الحصان مصل الدم الوقاية

Introduction

La rage, maladie mythique connue depuis plus de 4000 ans, conserve jusqu'à nos jours son auréole de terreur au sein des populations ; du fait qu'elle soit toujours mortelle chez l'homme, lorsqu'elle est déclarée. Elle constitue un problème de santé majeur ; l'Organisation mondiale de la santé (OMS) classe la rage au dixième rang en ce qui a trait à la mortalité attribuable à l'une ou l'autre des maladies infectieuses dans le monde. (PICARD. 2012)

La rage tue environ 59 000 personnes chaque année dans le monde, en moyenne un décès chaque 10 minutes, essentiellement dans les pays en voie de développement. La distribution de la rage humaine reflète celle de la rage animale. A l'instar des autres pays en développement, l'Algérie est également un pays infecté par la rage animale et humaine. Elle été classée comme zoonose majeure par les pouvoirs publique et a fait l'objet de plusieurs études épidémiologiques. (DAO, 2007).

La rage provoque une encéphalite mortelle qui peut atteindre tout être vivant à sang chaud. Une fois la maladie déclarée le patient est condamné. C'est pour cela que la prophylaxie qu'elle soit sanitaire ou médical doit être rigoureuse et avec le moins de risques aux patients. Le développement de la biotechnologie a permis d'élaborer différents moyens de luttés contre le virus. La sérothérapie qui est en vérité la seule issue en cas de contamination confirmée ou suspectée, elle se présente sous différentes formes : les anticorps polyclonaux et les anticorps monoclonaux. L'utilisation de ces différents produits est établie selon des avantages et inconvénient de chacun d'eux.

L'objectif de ce MASTER, est d'approfondir nos connaissances concernant la production de sérum polyclonal au sein de l'institut PASTEUR ainsi que la technique RFFIT utilisé pour le contrôle du sérum. Ce projet est constitué d'une partie bibliographique qui décrit la maladie de la rage et l'agent causal, les sérums antirabiques utilisés en PPE travers le monde, et une partie expérimentale qui décrit le processus de fabrication du sérum et les résultats du test RFFIT.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

GENERALITES SUR LA RAGE

1. Virus de la rage

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

Classification

L'ordre des Mononégavirales.

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

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

Structure

Le virus se présente sous la forme d'un bâtonnet, Il mesure en moyenne 75 nm de diamètre pour une longueur variant de 130 à 300 nm, Avec une extrémité plate et l'autre arrondie, lui conférant un aspect en "balle de revolver" tout à fait caractéristique, il existe deux autres formes : filamenteuse et ronde.

C'est un virus enveloppé avec une nucléocapside à symétrie hélicoïdale (DECOSTER, s. d.)

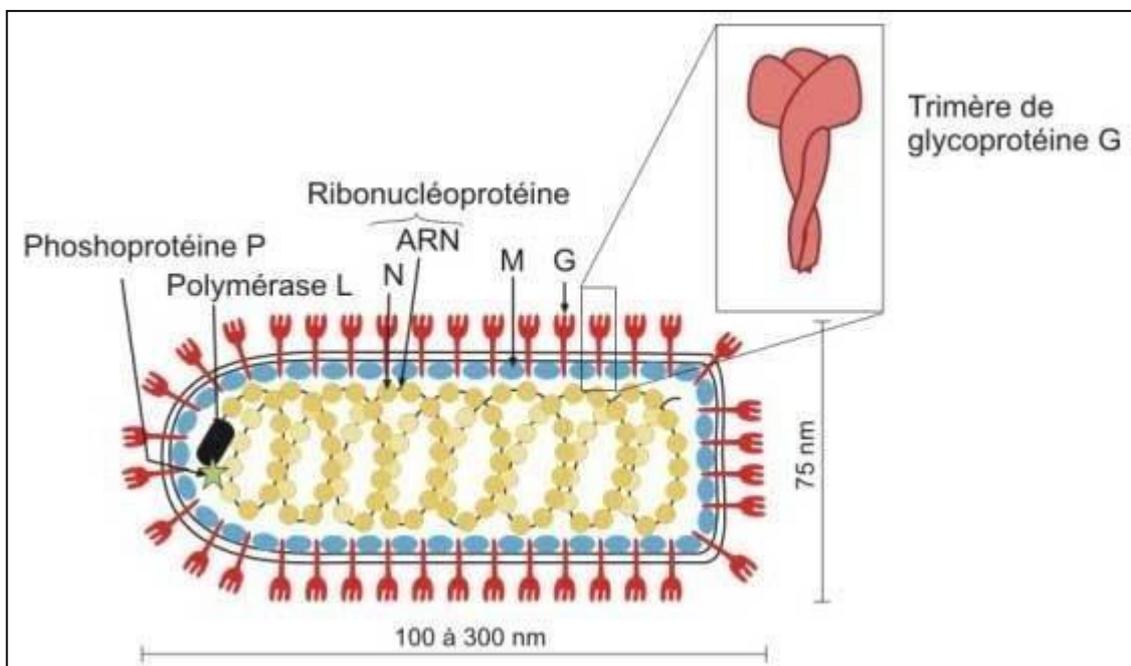


Figure 1 : Schéma représentatif du virus rabique en forme de balle de revolver (RHABDOVIRIDAE, s. d.).

Multiplication du virus

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

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

2. Épidémiologie

Source du virus

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

Cycle sylvatique et urbain

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

Les principaux réservoirs de la rage urbaine sont les chiens.

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

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

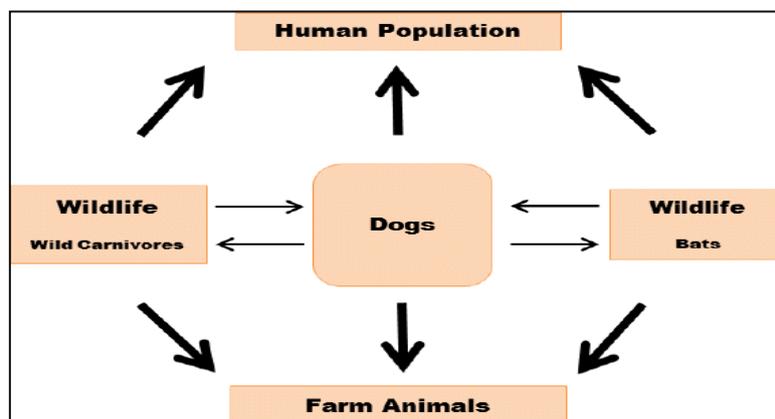


Figure 2 : Cycle de transmission de la rage (RHABDOVIRIDAE, s. d.)

Mode de transmission du virus

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

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

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

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

3. Symptômes

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

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

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

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



Figure 3 : Un chien enragé avec de la salive dégoûtante de la bouche. (HUMANLIFE, 2019)

Rage furieuse

Chez les animaux les premiers symptômes de la rage furieuse sont . (RAGE ANIMALE, s. d.):

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

Si l'animal est de nature agitée, il pourra être très tranquille et même chercher à se cacher. À noter que les animaux sauvages deviennent souvent anormalement sociables et n'auront plus peur des humains. Les animaux nocturnes peuvent aussi devenir diurnes lorsqu'ils sont infectés. Par la suite, il y aura début progressif de la paralysie du larynx et une augmentation de la salivation. Le larynx étant paralysé, il est difficile pour l'animal d'avaler sa salive ce qui donne le symptôme classique de la rage où l'animal salive abondamment. Lorsque ces symptômes arrivent, l'animal meurt d'asphyxie, habituellement dans les 7 jours suivants, due à la paralysie du larynx-pharynx et autres muscles servant à la respiration (RAGE ANIMALE, s.d.).

Rage paralytique (ou muette)

Cette forme est caractérisée par une période d'excitation beaucoup moins prononcée que la forme furieuse. Il y aura quand même changement de comportement chez les animaux sauvages comme l'inhibition de la peur de l'homme. Il y a aussi la paralysie graduelle du système respiratoire qui s'installe et mort par asphyxie chez cette forme aussi. Chez l'humain, les symptômes commencent par de la fièvre, des maux de tête. Par la suite, il y a aussi une phase d'excitation suivie d'anxiété de confusion de sensibilité à la lumière, d'une peur de l'eau, puis d'hallucination. La paralysie du système respiratoire s'enchaîne et une mort par asphyxie s'en suit (RAGE ANIMALE, s. d.).

4. Diagnostic de la rage

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

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

Diagnostic chez les animaux

Chez les animaux la rage est diagnostiquée à l'aide du test d'immunofluorescence directe. Le but est de trouver les antigènes dans le tissu cérébral. L'animal doit être euthanasié pour le

test. La collection de l'échantillon issu du cerveau de l'animal suspecté et son expédition vers un laboratoire de diagnostic prend du temps bien que la conduite du test nécessite environ 2 h seulement (GARG, 2014).

Diagnostic chez l'être humain

Durant l'infection, le virus rabique est dissimulé à la surveillance immunitaire par sa localisation intra neuronale. Les anticorps dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien sont pratiquement pas détectables voir rarement détecté avant la déclaration de la maladie ou pendant sa progression. Par conséquent aucun test est fiable pour diagnostiquer l'infection rabique chez l'homme avant l'installation des signes cliniques (GARG, 2014).

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

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

Diagnostic de laboratoire

En résumé, le diagnostic de laboratoire de la rage animale et humaine peut être fait par 4 méthodes : histopathologie, culture du virus, sérologie et détection de l'antigène du virus. Bien

que chacune des 3 premières méthodes présente des avantages distincts, aucune n'offre un diagnostic définitif rapide (VIRAL ZOONOSES, .s. d.).

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

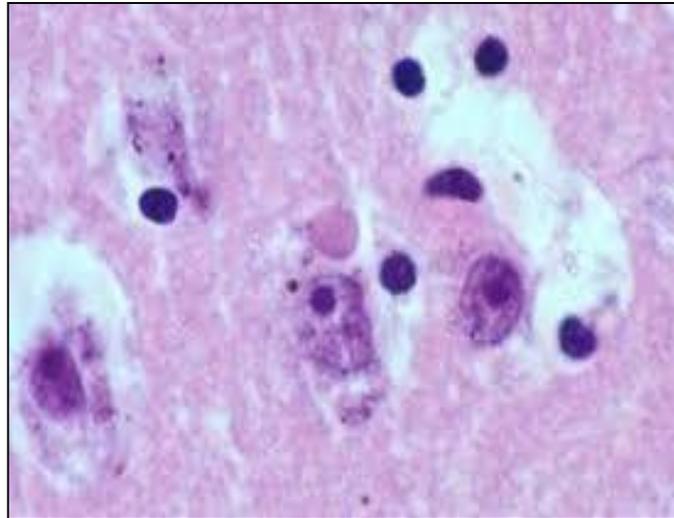


Figure 4: Corps de Negri ; inclusions cytoplasmiques dans cellules de cerveau de chien, signe de l'infection (RABIES DIAGNOSIS, s. d.)

Culture de virus : le moyen de diagnostic le plus définitif est la culture de virus à partir de tissus infectés. La méthode la plus couramment utilisée pour l'isolement du virus consiste à inoculer la salive, les tissus des glandes salivaires et les tissus cérébraux par voie intracérébrale à des souris. Les souris devraient développer une paralysie et la mort dans les 28 jours. À la mort, les cerveaux sont examinés pour la présence du virus par immunofluorescence (VIRAL ZOONOSES, s. d.).

Sérologie : les anticorps circulants apparaissent lentement au cours de l'infection, mais ils sont généralement présents au moment de l'apparition des symptômes cliniques. Les tests sérologiques les plus couramment utilisés étaient le test de neutralisation de l'infection de souris ou le test d'inhibition rapide de la focalisation fluorescente. La sérologie représente la méthode la plus utile pour le diagnostic de la rage (VIRAL ZOONOSES, s. d.).

Détection rapide des antigènes viraux (voir figure 5) : ces dernières années, la détection d'antigènes viraux par immunofluorescence était devenue largement utilisée. Le tissu potentiellement infecté est incubé avec un anticorps marqué à la fluorescéine. Les cellules sont examinées par microscopie fluorescente pour la présence d'inclusions intracytoplasmiques fluorescentes. Les échantillons habituellement utilisés sont des empreintes cornéennes (obtenues en abrasant doucement la cornée avec une lame microscopique) ou une

biopsie cutanée du cou (les cellules examinées sont les nerfs sensoriels) (VIRAL ZONOSSES,, s. d.).

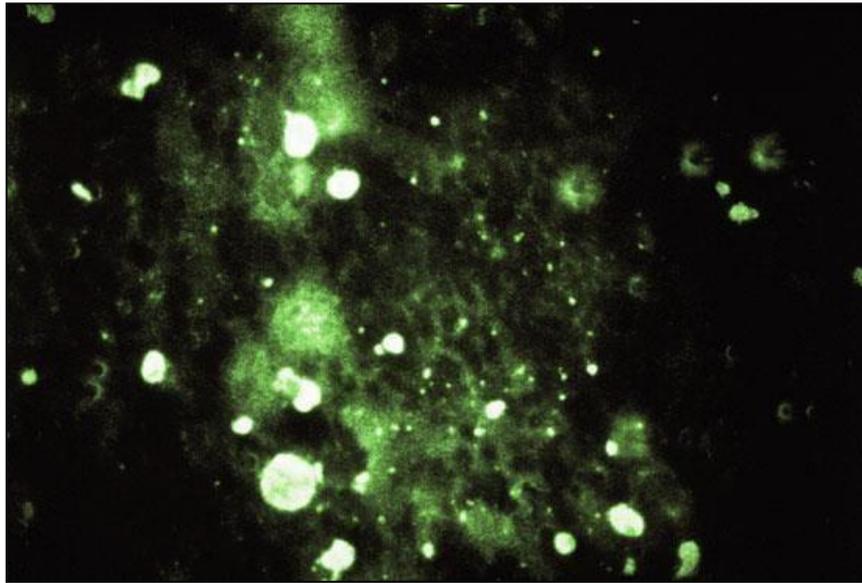


Figure 5 : Micrographie révélant un résultat positif de la présence d'antigène antirabique avec la technique d'immunofluorescence directe(GARG, 2014).

5. Traitement et prévention

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

Vaccination préventive

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

Le protocole est simple : 3 injections administrées à j0, j7, j28 et le rappel est effectué un an après. (MES VACCINS, s. d.).

Pour le chien ou le chat, la vaccination antirabique est pratiquée à partir de l'âge de 3 mois. La première vaccination dite « primovaccination » se fait généralement au moyen d'un vaccin dont le protocole d'emploi ne prévoit qu'une injection unique qui est valable pendant un an.

Les vaccinations suivantes, dites « de rappel », nécessitent une seule injection effectuée moins d'un an après la primovaccination (TPE, s. d.).

Prophylaxie post-exposition

Se compose des étapes suivantes :

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

Les catégories d'exposition à la rage selon l'OMS sont (WHO, 2018) :

Catégorie I : toucher ou nourrir les animaux, l'animal lèche la peau intacte (pas d'exposition).

Catégorie II : ronger une peau non couverte, égratignures ou écorchures mineures sans saignement (exposition).

Catégorie III : Morsures ou égratignures transdermiques simples ou multiples, contamination de la peau lésé ou muqueuse par la salive provenant de léchage d'animaux, expositions par contact direct avec des chauves-souris (exposition sévère).

La prophylaxie selon la catégorie d'exposition est résumée dans le tableau 1 :

Tableau 1: la prophylaxie post exposition recommandé selon la catégorie d'exposition (WHO, 2018).

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

SEROTHERAPIE ANTIRABIQUE

1. Conformation et structure d'un Anticorps

Les immunoglobulines (Ig) sont produites par les lymphocytes B et sécrétées dans le plasma. La molécule d'Ig sous forme monomère est une glycoprotéine d'un poids moléculaire d'environ 150 kDa qui a plus ou moins la forme d'un Y. La structure de base du monomère Ig (figure 6) est constituée de deux moitiés identiques reliées par deux liaisons disulfures. Chaque moitié est constituée d'une chaîne lourde d'environ 50 kDa et d'une chaîne légère d'environ 25 kDa, réunies par une liaison disulfure à proximité de l'extrémité carboxyle de la chaîne légère. La chaîne lourde est divisée en une partie Fc, qui est à l'extrémité carboxyle (la base du Y), et une partie Fab, qui est à l'extrémité amine (le bras du Y). Les chaînes glucidiques sont attachées à la partie Fc de la molécule. La partie Fc de la molécule d'Ig est composée uniquement de chaînes lourdes. Les régions Fc des IgG et IgM peuvent se lier aux récepteurs à la surface des cellules immunomodulatrices telles que les macrophages et stimuler la libération de cytokines qui régulent la réponse immunitaire. La région Fc contient des séquences protéiques communes à toutes les Ig ainsi que des déterminants uniques aux classes individuelles. Ces régions sont appelées les régions constantes car elles ne varient pas de manière significative entre les différentes molécules d'Ig au sein de la même classe. La partie Fab de la molécule d'Ig contient à la fois des chaînes lourdes et légères réunies par une seule liaison disulfure. Une paire de chaînes lourdes et une paire de chaînes légères se combinent pour former le site de liaison à l'antigène de l'anticorps. Chaque monomère Ig est capable de lier deux molécules d'antigène (ANTIBODY BASICS, s. d.).

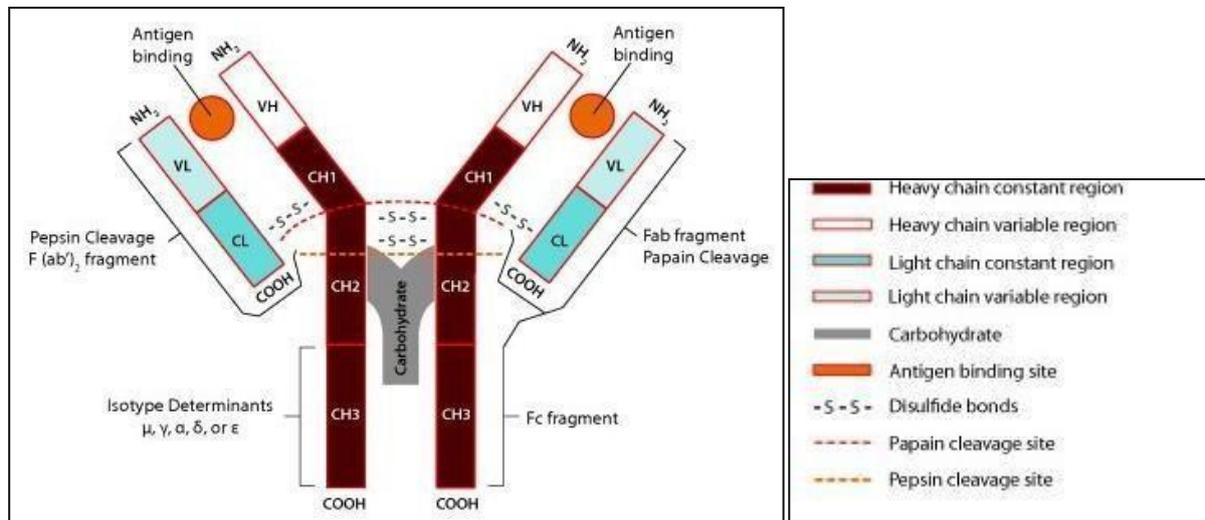


Figure 6 : Configuration structurale de l'anticorps(ANTIBODY BASICS, s. d.).

2. Implication de la Glycoprotéine G

Comme les autres membres du genre *Lyssavirus*, famille Rhabdoviridae, le virus de la rage possède un ARN monobrin négatif porteur de cinq protéines : une nucléoprotéine, une phosphoprotéine, une protéine de matrice, une glycoprotéine d'enveloppe (RVGP) et une polymérase virale. L'immunisation avec le virus entier inactivé induit des anticorps neutralisants dirigés contre le RVGP et activent les lymphocytes T helper et cytotoxiques. Le RVGP est le seul antigène capable de conférer une protection complète contre la rage, il est aussi le seul composant présent dans tous les nouveaux vaccins antirabiques qui ont été proposés. La molécule de RVGP (Figure 7) est entièrement immunogène, portant des épitopes pour activer la réponse de l'immunité humorale et celle à médiation cellulaire. Il a été démontré que le RVGP est un déterminant important pour l'induction de la réponse de l'immunité innée et dans différents mécanismes pathogènes induits par plusieurs souches du virus de la rage (ASTRAY, 2017).

Le RVGP natif est situé dans l'enveloppe du virus de la rage et la membrane plasmique des cellules infectées avant le bourgeonnement du virus. Le RVGP natif est une glycoprotéine de 505 acides aminés, 65 kDa qui contiennent une région intra cytoplasmique, une région transmembranaire hydrophobe et une région extra cytoplasmique appelée ectodomaine. L'association de trois monomères de RVGP entraîne l'homotrimérisation de la molécule. Il est capable de se lier à au moins à trois récepteurs différents, permettant l'endocytose virale. Le récepteur de la neurotrophine (p75NTR), le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, et la molécule d'adhésion des cellules neurales (N-CAM) (ASTRAY, 2017).

Il a été démontré que le RVGP peut être trouvé dans trois conformations antigéniques différentes : un état « natif », un état hydrophobe activé et un état de fusion inactive. En plus

du fait que ces différentes conformations de RVGP sont très importantes pour les processus de bourgeonnement et fusion du virus, ils présentent différents épitopes et ne sont pas reconnus par les anticorps neutralisants dirigés contre le RVGP mature ou natif de façon égale (ASTRAY, 2017).

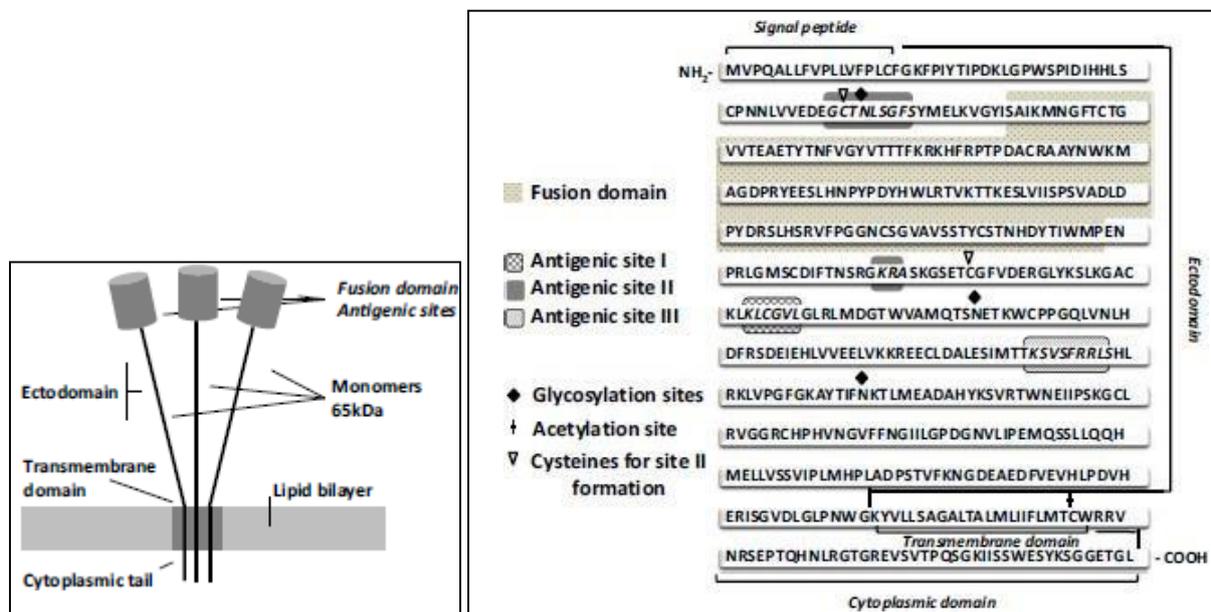


Figure 7 : Structure détaillée de la Glycoprotéine G en montrant les trois domaines antigéniques (ASTRAY, 2017).

3. Anticorps polyclonaux

Les anticorps polyclonaux sont un mélange d'anticorps reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné (la glycoprotéine G concernant le virus rabique), chaque idiotype étant sécrété par un clone de lymphocyte B différent(WIKIPEDIA, 2020).

Ces AC polyclonaux sont produits généralement par des animaux après les avoir immunisés contre l'antigène cible. Des saignées sur ses animaux sont pratiqués afin d'évaluer les AC produits par ses derniers. L'isolement du sérum puis une purification des AC est faite à partir du sérum. Plusieurs espèces sont candidats pour cette procédure. Les espèces animales les plus utilisées pour la production d'AC polyclonaux sont le lapin, la souris, le rat, le hamster, le cochon d'Inde, la chèvre, le mouton et le poulet. Si une grande quantité d'AC est demandé le cheval est le meilleur candidat pour subvenir à cette requête. L'entretien doit être rigoureux pour prendre soins de ces animaux surtout ceux de grande taille comme le cheval. Des méthodes non invasives, citant l'extraction des immunoglobulines à partir de lait de bovin, ovin et caprin qui peut aussi donner de grand volume d'AC (MISTRETTA, s. d.).

Deux types de sérum sont utilisés en PPE lors de la rage :

RIG d'origine Equin ERIG : extraites et purifiées du sérum de chevaux hyperimmunisés, elles sont efficaces et pas onéreuses. Elles sont bien tolérées d'où le test de sensibilité n'est pas recommandé. Produit sur des chevaux ou des mules par voie sous cutanée sur une période de deux mois avec une souche virale inactivée à la bêta propriolactone. Une digestion à la pepsine suivie d'une précipitation au sulfate d'ammonium et d'une purification par chromatographie échange d'ions permet d'obtenir des fragments F (ab') hautement purifiés (BOURHY, 2010).

Le RIG d'origine humaine HRIG : comme le nom l'indique préparé à partir de plasma obtenu par sujet volontaire vacciné contre la rage indemne de contaminant (virus HBV, HCV, HIV, etc.) Elles sont par contre plus chères mais très efficaces et parfaitement tolérées ce qui élimine le risque anaphylactique ainsi que les maladies sériques. Les donneurs vont subir plusieurs rappels avant la première récolte d'immunoglobulines qui se fait par plasmaphérèse (BOURHY, 2010).

Effet secondaire et contre-indication :

La posologie et le plan séro-vaccinal est le même peu importe l'âge, le sexe ou l'état sanitaire (gestation, immunodépression) du patient. Les HRIG sont très bien tolérées. Les ERIG par contre étaient source de réaction anaphylactique, mais depuis quelque temps un processus de purification et de séparation est établie qui fait que le risque et la gravité d'allergie a grandement diminué (BOURHY, 2010).

Des effets secondaires ont pu être décrits concernant les HRIG et ERIG :

- Les signes locaux : douleur au site d'inoculation, raideur du membre ;
- Les signes généraux : fièvre, malaise, céphalée, œdème angio-neurotique, syndrome néphrotique, anaphylaxie ;
- Le risque infectieux de l'immunoglobuline humaine (malgré le contrôle des donneurs, contrôle microbiologique et les traitements par la chaleur et la purification)

Il n'existe aucune contre-indication lors de PPE, compte-tenu la mort certaine que la rage provoque (BOURHY, 2010).

4. Anticorps monoclonaux

a. Production des Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps dérivés d'une seule cellule lymphocytaire B clonée. Par conséquent ils sont très spécifique et peuvent s'agripper qu'à un seul épitope sur l'antigène, utilisé comme moyen de diagnostic en microbiologie et dans le traitement des cancers, et bien sûr en ce qui nous intéresse en PPE lors de cas de contamination suspecte ou confirmé de rage (PRODUCTION INDUSTRIELLE DES ANTICORPS, 2018).

La production des AC monoclonaux se passe en deux temps principaux :

Premier temps, une production *in vivo* (l'immunisation). Puis, une hybridation et sélection *in vitro* de l'hybridome producteur d'AC. Une fois sélectionné, une multiplication accrue est faite soit *in vivo*, soit *in vitro* afin d'obtenir de grande quantité d'AC (MISTRETTA, s. d.).

La première étape consiste à injecter à un animal de laboratoire, l'antigène contre lequel on veut créer des AC. Nous assistons ensuite à une extraction de la rate et d'autres organes lymphoïdes pour isoler les lymphocytes B (MISTRETTA, s. d.).

L'hybridation consiste à mettre les lymphocytes B isolés avec des cellules myélomateuses cultivées sélectionnées *in vitro* pour leurs déficiences en hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT⁻) ou, plus rarement, en thymidine kinase (TK⁻). Les deux types cellulaires vont fusionner grâce à l'ajout du polyéthylène glycol et le tout sera mis dans un milieu de culture sélectif appelé milieu HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine et Thymidine). Dans ces milieux-là, les cellules du myélome doublement mutées seront incapables de synthétiser des nucléotides. La voie de synthèse *de novo* est bloquée par l'aminoptérine du milieu HAT et la voie de récupération est impossible vu la déficience en enzyme HGPRT ou TK. La deuxième mutation qui consiste à une mutation Ig- pour les empêcher de synthétiser des AC. Ainsi, les cellules du myélome ne sont là que pour apporter le caractère d'immortalité aux lymphocytes B productrices des AC contre l'épitope d'intérêt (MISTRETTA, s. d.).

Après mise en culture et prolifération de seulement les hybridomes. Chaque hybridome va donner un type d'AC unique contre un type d'épitope. Le but ensuite est de sélectionner les hybridomes produisant les AC monoclonaux désirés pour en produire une grande quantité (PRODUCTION INDUSTRIELLE DES ANTICORPS, 2018).

Deux types de productions sont proposés : une production *in vitro* qui donne de très faible concentration d'AC ou une production *in vivo* après injections intrapéritonéales chez des souris (des souris de la même souche qui a été utilisée pour l'immunisation afin d'éviter les

problèmes d'histocompatibilité). Cette dernière permet une plus grande concentration d'AC monoclonaux dans le liquide d'ascite(MISTRETTA, s. d.).

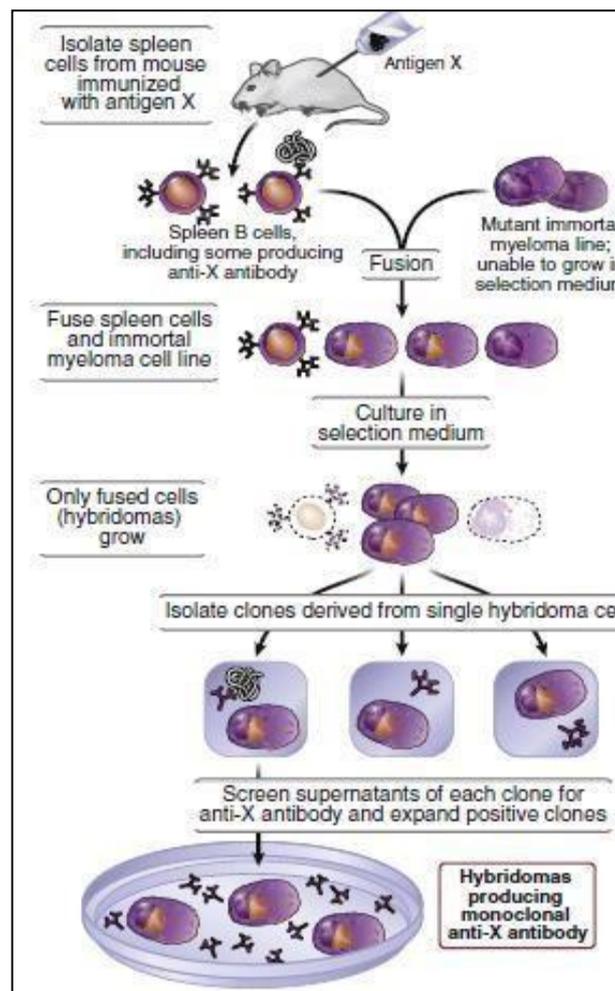


Figure 8: Schéma représentant les étapes de fabrications des hybridomes dans le but de produire des anticorps monoclonaux (ABBAS, 2016).

b. Types d'anticorps à travers le temps :

Dès 1975, l'utilisation des AC murin était bien immunogène, quoique leurs durées de vie dans l'organisme fussent très courtes et les patients traités produisaient des AC anti-souris (HAMA). En 1984, l'introduction à l'humanisation des AC avait commencé par le processus de chimérisation, une méthode qui consiste à combiner les domaines variables de l'AC murin avec les domaines constant d'AC humain. Il en résulte une molécule à 70% humaine, les AC chimériques ont conservé avec succès la spécificité de l'anticorps parent de souris et ont diminué son immunogénicité, mais ont tout de même suscité une réponse d'anticorps anti souris (HAMA) (JUAN, 2008).

Pour réduire encore plus l'immunogénicité, en 1988 des anticorps humanisés étaient produits. Elle représente la troisième génération d'AC monoclonaux et consiste à seulement mettre les

parties hypervariables murin sur les AC humains. Appelés les CDR, les régions déterminant la complémentarité (appartiennent aux chaînes légères des AC) Ils déterminent l'avidité de l'immunoglobuline, et la spécificité pour quelques antigènes. Il faut avoir recourt le plus souvent à une greffe de CDR (WIKIPEDIA, 2020).

En fin des années des 90s, la dernière génération a vu le jour. Les AC complètement humain étaient produits par hybridome humain (très délicat) ou autre méthodologie comme les souris transgéniques humanisées (les gènes d'anticorps humains sont introduits à la place du matériel génétique immunitaire de la souris) (MISTRETTA, s. d.).

Dans certain cas, l'utilisation de l'AC entier n'est pas indispensable des fragments d'anticorps (Fab - antigen-binding Fragment, scFv - single-chain Fragment variable) s'est avéré plus intéressant (MISTRETTA, s. d.).

c. Anticorps monoclonaux utilisé dans la rage :

Les premiers anticorps neutralisants ont été clonés par la fusion entre des lymphocytes B humaines immortalisées avec le virus Epstein-Barr, obtenues à partir de volontaires immunisés contre la rage, et myélome murin ou des lignées cellulaires d'hétéromyélome pour créer des hybridomes (KRAMER et COLL. 2005). PROSNIAK et *al.* (2003) ont d'abord combiné trois anticorps humains clonés pour créer un « cocktail » capable de neutraliser complètement une variété de VR fixes et de rue. Deux de ces AC (CR57 and CRJB) se fixe sur le même épitope qui se trouve sur le domaine antigénique I de la RVGP. Des souches mutantes virales qui ont acquis une résistance à l'un des AC, ils ont été démontrés également résistant au deuxième. Après plusieurs recherches, d'autre AC était découvert comme le CR4098 qui interagissait avec le domaine III du RVGP. Cette protection croisée a été démonté, si un des AC se retrouve résisté par le virus mutant, le deuxième pourra neutraliser le virus (KRAMER, 2005) (NAGARAJAN, 2008).

PARTIE EXPERIMENTALE

Objectif du présent travail

Jusqu'à présent, le seul moyen médical de lutte contre la rage est la prophylaxie pré et post exposition. L'objectif de cette partie est de décrire le processus de fabrication du sérum antirabique de cheval à l'Institut Pasteur d'Alger. Cette partie nous permet de faire une étude descriptive de la fabrication de sérum antirabique produit en Algérie, de l'immunisation des chevaux jusqu'au titrage d'anticorps antirabique par le test RFFIT.

2. Matériels

Le service des sérums thérapeutique situé à l'institut pasteur de DELY IBRAHIM est constitué de 3 unités :

- Une unité de production de sérums brute qui comprend une salle de saignée et un atelier d'entretien des animaux venimeux.
- Une unité de purification.
- Une unité de recherche pour le développement des venins

Pour la production du sérum antirabique brute, le matériel suivant est utilisé au sein de l'unité de production de sérums brute :

- Chevaux : âgées de 4 à 8 ans
- Système de collecte de plasma : PCS®2 HAEMONETICS®
- Des poches collectives de 10 litres
- Des tubulures
- Un trocart
- Des seringues de 50ml
- Des aiguilles de 18/19G
- Des ceintures (garrot)
- La Bétadine et du Cotton
- Un anticoagulant de 500ml (3 poches requise pour un cycle de collecte de plasma)
- Des cathéters
- Le filtre presse
- Des spatules
- Thermo coagulateur
- Sulfate d'ammonium
- Pepsine
- L'acide trichloracétique et de citrate
- Des hémodialyseurs

- Des filtres
- Cellule BHK-21
- Virus d'épreuve : souche CVS-11
- Sérum étalon de référence OMS (30 UI/ml, WHO-2 SRIG).
- Sérums à expertiser produits sur chevaux, conservé à -30°C.



Figure 9: La plasmaphérèse reliée à une poche de collecte et un anticoagulant par des tubulures. Photo personnelle

3. Méthodes

Nous procédons selon la méthode utilisée à l'IPA.

La production du sérum antirabique sur chevaux comporte 4 étapes principales :

- L'immunisation des chevaux contre le virus rabique
- La récolte du sérum de chevaux immunisés (La plasmaphérèse)
- Le titrage du sérum antirabique récolté
- La purification du sérum antirabique

a) Choix des animaux

Dans une première étape uniquement les animaux en bon état de santé sont sélectionnés pour la production de sérum hyperimmuns. Puisque, les chevaux sont très exposés au tétanos ils sont préalablement vaccinés contre le tétanos.

b) Immunisation primaire

Les animaux sélectionnés reçoivent une série d'injections de vaccin inactivé à usage humain en volumes croissants. Toutes les injections sont administrées par voie sous-cutanée dans la face latérale du cou. Le protocole de vaccination comprend 3 injections du vaccin antirabique inactivé à une semaine d'intervalle entre chaque injection de 15ml, 25ml et 35ml respectivement.

c) Immunisation secondaire

Dans cette étape 30 ml de virus vivant fixe de la souche LPS, produit sur matière cérébrale de souris sont inoculés aux chevaux de la même manière que le vaccin (Figure 6). De plus, 5ml de Ca Cl₂ sont injectés aux animaux. Seuls les animaux jugés " bon répondeurs " seront retenus pour la production du sérum antirabique.



Figure 10: Immunisation secondaire d'un cheval par le virus rabique (Souche LPS).

Photo personnelle

d) La plasmaphérèse

Le but de la saignée est de prélever le sérum des animaux immunisés contre le virus rabique. La récolte du sérum se fait 11 jours après l'immunisation secondaire des animaux, dans une salle de saignée appropriée.

Le cheval est placé dans un box à contention pour assurer la sécurité des manipulateurs. Un garrot est réalisé au niveau de l'encolure au moyen d'une ceinture. Après désinfection de la peau, un trocart est introduit au niveau de la veine jugulaire. Par la suite, un cathéter relié à une tubulure est introduit dans la veine, cette dernière est reliée à un système de collecte de plasma appelé machine de plasmaphérèse.

L'aphérèse a pour but de séparer le plasma des autres éléments figurés du sang. Cette technique est utilisée dans la production du sérum antirabique à l'IPA. Le sang du cheval est extrait depuis la veine jugulaire par le biais d'un trocart, par la suite, le plasma est séparé des autres éléments du sang par centrifugation au moyen d'un appareil et récupéré dans une pochette (Figure 7). Selon l'état sanitaire du cheval 5 à 8 litres de plasma sont récoltés puis conservés à +4°C.



Figure 11 : Processus de récolte de sérum chez un cheval par plasmaphérèse.

Photo personnelle

e) Titrage du sérum antirabique récolté

La méthode RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) décrite par Smith et al. (1973) est réalisée dans des LabTek de 8 puits. Cette technique est basée sur le titrage des anticorps antirabique sur culture cellulaire.

- Les cellules BHK-21 sont cultivées dans un milieu DMEM supplémenté de sérum de veau fœtal inactivé, 10% d'un bouillon de tryptose phosphate, des antibiotiques et de la glutamine.
- Les sérums à expertiser sont chauffés à 56°C pendant 30 min avant utilisations.
- Des dilutions en série des sérums à expertiser et celui du sérum de référence sont incubées avec la souche CVS-11 (Tableau 2). Pour cela, 0.1ml de virus CVS est déposé dans chaque puits, auquel nous rajoutons 0.1ml de sérum. Nous utilisons un témoin cellule (0.2 ml de milieu à la place de 0.2 ml du mélange sérum et virus) et un témoin virus (composé de 0.1 de milieu à la place de 0.1 de sérum).
- Le mélange est ensuite incubé pendant 1h à 37°C sous gaz carbonique. Nous rajoutons 0.2ml de suspension de cellules BHK-21 (10^6 de cellule/ml).
- Le mélange est incubé une seconde fois pendant 48h sous CO₂ à 37°C.

- Les LabTeksont colorés à l'aide du conjugué antirabique couplé à la fluorescéine dans une chambre noir à 37°C pendant 90 minutes.
- Les lamelles sont séchées et lavées dix minutes dans le PBS, puis rincées.
- La lecture des lamelles se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence au grossissement x160. Pour cela, 20 champs de chaque puits sont examinés. Un champ est positif s'il existe moins de deux foyers fluorescents.

Les dilutions utilisées lors de notre travail sont citées dans le tableau 2 :

Tableau 2: Les dilutions des sérums utilisés dans le présent travail

Dilutions	
Les sérums à expertiser	Le sérum de référence
1/250	1/100
1/500	1/200
1/1000	1/400
1/2000	1/800
1/4000	1/16000
1/8000	1/32000
1/16000	TC
1/32000	TV

f) Purification du sérum antirabique

Après la récolte du sérum, celui-ci est envoyé à l'unité de sérum thérapeutique de l'IPA situé à Kouba. Le sérum est purifié au sulfate d'ammonium. C'est la méthode la plus couramment utilisée pour éliminer les protéines de la solution. Cette dernière est une purification assez brute et non spécifique qui élimine la majorité des protéines plasmatiques et laisse la fraction d'immunoglobulines. Lorsqu'elles sont en solution, les protéines forment des liaisons hydrogène avec l'eau à travers leurs groupes polaires et ioniques exposés. L'ajout de petits ions tels que l'ammonium ou le sulfate élimine les molécules d'eau de la protéine, ce qui entraîne la précipitation de la protéine hors de la solution (BIOSYN, s. d.).

- Cette précipitation au sulfate d'ammonium se fait dans un filtre presse qui sépare la partie liquide (le surnageant) et solide (le précipité), ce dernier qui contient les gammas immunoglobulines est retenu et recueilli par des spatules et le surnageant est éliminé.

- Ensuite viens l'étape de l'hydrolyse des molécules d'anticorps soit par la papaïne qui conduit à la formation de deux fragments Fab et d'un fragment Fc soit par la pepsine qui conduit à la formation d'un seul fragment F (ab')₂ où les deux fragments Fab restent liés par deux ponts disulfures et le fragment Fc est scindé en plusieurs peptides. Les fragments Fab et F (ab')₂ ont la capacité de se lier aux antigènes mais le fragment F (ab')₂ le fait avec une plus grande affinité, d'où l'utilisation de la pepsine a l'institut pasteur.
- Une fois la digestion par la pepsine est effectuée, une thermo coagulation différentielle est réalisé, cela va permettre de coaguler la partie FC qui devient solide et la partie F (ab')₂ reste sous forme liquide, cette fois ci la partie solide est éliminé et le surnageant est retenu. Ensuite une deuxième précipitation au sulfate d'ammonium est pratiquée sur le surnageant visant à obtenir plus de pureté et de retenir le maximum de fragments F (ab')₂ qui seront solubilisé dans l'eau purifié.
- Puis une dialyse qui est la méthode la plus utilisée pour changer la concentration en sels d'une solution protéique par des hémodialyseurs (6 à 12) est exécutée, afin d'éliminer les éléments à faible poids moléculaires (ions, sels...etc.), une clarification dans le filtre presse s'ensuit en utilisant une préparation à base d'acide trichloracétique et de citrate, qui va permettre de produire un gel qui sert à éliminer plus de contaminants lors du passage de la solution.
- L'avant dernière étape correspond à la formulation qui permet de vérifier les titres d'anticorps par le test RFFIT.
- Enfin la filtration stérilisante sur membrane est faite dans des conditions aseptiques et plusieurs filtres de diamètre décroissants sont utilisés jusqu'à 0.22 micron. Des tests de contrôles de qualités (innocuité, efficacité) seront effectués avant et après la répartition du sérum purifié.

4. Résultats :

La méthode de calcul du titre d'anticorps neutralisants utilisée dans le présent travail est celle de SPEARMAN KARBAR (Ramakrishnan, 2016). Cette méthode est basée sur la détermination de la valeur DE50 qui est le titre du sérum antirabique qui protège à 50%. La DE50 est déterminé à partir de la formule suivante :

$$\text{Log}_{10} \text{ du point final (de la dilution correspondante) } 50\% = - (x_0 - d/2 + d \sum r_i/n_i)$$

$x_0 = - (\log_{10} \text{ de la plus faible dilution ou les puits sont positifs})$

$d = \log_{10}$ du pas de dilution, un dans le cas présent

n_i = nombre de champ observé

r_i = nombre de puits positifs

Un exemple de calcul dans le tableau suivant (tableau3) :

Tableau 3: Observation et interprétation des résultats de RFFIT

Dilutions	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/32000
Champs fluorescents	0/20	0/20	0/20	0/20	1/20	2/20	10/20	20/20
Champs non fluorescents	20/20	20/20	20/20	20/20	19/20	18/20	10/20	0/20

Les dilutions dans le tableau 3 sont à raison de 2. Les champs fluorescents sont plus présents dans les dilutions à faible concentration de sérum.

Suivant la méthode de SPEARMAN KARBAR :

- $x_0 = \log_{10} 2 = 2.39$
- $d = \log_{10} 250 = 0.3$

\log_{10} du point final (de la dilution correspondante) 50% = $- 2.39 - (0.3/2 + 0.3 (20/20 + 20/20 + 20/20 + 20/20 + 19/20 + 18/20 + 10/20 + 0/20))$

\log_{10} du point final (de la dilution correspondante) 50% = $- 2.39 - (0.15 + 1.905)$

\log_{10} du point final (de la dilution correspondante) 50% = $- 4.15$

La dilution terminale (DE50) = $10^{-4.15}$

Nous exprimant l'activité du sérum à expertiser en UI/ml. Puis nous procédons au calcul de la différence entre les logarithmes des points 50% des deux sérums, nous multiplions par le nombre d'UI contenu dans le sérum de référence qui est de 30 UI, suivant l'exemple précédent. Tout en mentionnant que la DE50 du sérum de référence qui est de $10^{-3.20}$ (30 UI/ml).

De ce fait : $- 3.20 - (- 4.15) = 0.95$.

La DE50 du sérum à expertisé est de $10^{0.95}$ soit 8.91 fois plus actif que le sérum de référence.

L'activité du sérum à expertiser est de : $0.95 \times 30 = 267$ UI.

Résultat des observations des titrages au microscope

Dans le tableau 4, nous avons mis les résultats du sérum de référence concernant les observations au microscope à fluorescence.

Tableau 4: Résultats des titrages d'anticorps antirabique par RFFIT en nombre de champs des 6 lots de sérum à expertiser produit à l'IPA.

Dilutions	1/250	1/500	1/100	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/32000
N° Lot	Champs observé							
1	0/20	0/20	0/20	0/20	1/20	2/20	10/20	20/20
2	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	5/20	20/20
3	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	10/20	20/20
4	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	5/20	18/20	20/20
5	0/20	0/20	0/20	0/20	3/20	8/20	20/20	20/20
6	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	2/20	20/20	20/20
OMS	0/20	0/20	0/20	0/20	1/20	2/20		

Concernant les résultats d'observation des puits des lots à expertiser suivant le tableau 5, tous les champs observés de la dilution 1/250 à la dilution 1/2000 sont négatifs, pour le reste des dilutions des résultats positifs se sont manifestés de façon graduelle suivant la dilution. A la dilution 1/32000 tous les champs observés de tous les lots sont positifs.

Suites aux observations, nous avons procédé au calcul de la DE50 du lot de référence et des lots à expertiser présentés dans le tableau 5. Puis nous avons convertie les titres d'anticorps en UI en utilisant le titre du sérum de référence exprimé en UI/ml (30UI/ml) avec une DE50 de $10^{-3.20}$.

Dans le tableau 5, les titres en DE50 sont convertis en UI/ml :

Tableau 5: Résultats des titres d'anticorps antirabiques exprimés en UI/ml

N° Lot	DE50	Titre en UI/ml
1	$10^{-4.15}$	267
2	$10^{-4.27}$	352
3	$10^{-4.20}$	300
4	$10^{-4.50}$	189
5	$10^{-3.88}$	143
6	$10^{-4.02}$	212
Sérum OMS	$10^{-3.20}$	30

Les titres en UI des lots de sérums à expertiser varient de 143 UI pour le lot N°5 à 352 pour le lot N°2. La moyenne du titrage de ces lots est de 244 UI.

Les valeurs des titres d'anticorps antirabiques en UI sont représentées dans l'histogramme suivant (figure 12).

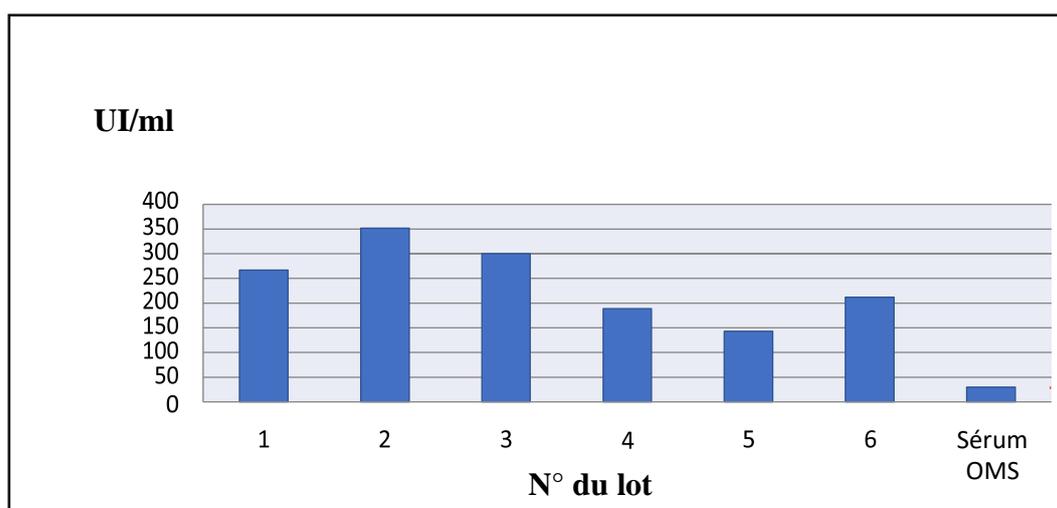


Figure 12 : L'histogramme suivant montre les variations des titres d'anticorps antirabiques neutralisants.

La figure 12 montre que les titres des anticorps antirabiques des 6 sérums expertisés produit à l'IPA sont nettement supérieurs au titre des anticorps antirabiques du sérum de référence OMS. Le titre le plus élevé en anticorps neutralisant (352UI/ml) du lot N°2 dépasse largement le titre en anticorps recommandé par l'OMS (30UI/ml).

Produit fini

Le sérum est mis dans un flacon de 5ml puis distribué dans tout le territoire national. Il est indispensable en cas d'exposition au virus rabique de catégorie de type 3.



Figure 13: Sérum antirabique conditionnée et étiqueté produit à l'IPA.

Photo personnelle

Discussion

La sérothérapie antirabique est primordiale en prophylaxie post exposition (Particulièrement lors d'exposition de catégorie 3). La neutralisation du virus rabique doit se faire dans les heures qui suivent son introduction dans l'organisme, avant que le virus n'atteigne le système nerveux périphérique. Selon JACKSON 2013, la souche fixe vivante peut être directement détectée dans les nerfs périphériques et dans les ganglions trijumeaux 18h après infection. Par déduction, une souche sauvage prendra plus de temps car une multiplication in situ a été démontrée dans les muscles, tendons et tissus conjonctifs avoisinant le site d'inoculation. Cependant, malgré la haute protection engendrée par la sérothérapie, celle-ci peut présenter certains inconvénients. Ainsi, nous discuterons les résultats récoltés dans le présent travail, à travers les avantages et les inconvénients des techniques adoptés à l'IPA pour la production du sérum antirabique de cheval, des méthodes utilisées pour le titrage du sérum produit localement.

Selon nos résultats obtenus suites aux titrages d'anticorps antirabiques avec la technique RFFIT, tous les sérums à expertiser ont montré des titres satisfaisants d'anticorps neutralisants avec une moyenne de 244UI. Les titres sont supérieurs à celui du sérum de référence de l'OMS qui est de 30UI.

➤ Facteurs intrinsèques

Etat de santé de l'animal : le titre en anticorps peut être lié aux capacités de l'animal à produire les anticorps antirabiques.

➤ Facteurs extrinsèques

- Influence du procédé de production du sérum sur les variations du titre.

Ces variations obtenues dans les titres antirabiques peuvent être liés au processus de fabrication.

Comparaison entre la technique par trocart et plasmaphérèse.

Au paravent la technique de prélèvement de sang utilisé consisté à prélever le sang total par un trocart, ce dernier est conservé dans des bocaux pour la sédimentation afin de récolter le sérum. De nos jours cette technique laborieuse et non éthique est remplacée par la plasmaphérèse qui permet la centrifugation immédiate du sang, le retour des éléments figurés à l'animal et récupération du sérum.

Des pertes peuvent également se produire lors de la purification des sérums. Cela est un inconvénient, car il n'a pas de procédé qui permet de différencier les anticorps neutralisant et non neutralisant.

- Influence de la technique de titrages des anticorps antirabique.

D'autre part, les variations du titre d'anticorps peuvent être liées à la technique de titrage utilisé à l'IPA.

Selon les directives de l'Organisation mondiale de la santé, un taux d'anticorps antirabiques supérieur ou égal à 0,5UI/ml démontre une réponse adéquate à la vaccination(CDC-ACIP, 2019).

Le test d'RFFIT peut s'avérer coûteux et très laborieux nécessitant un laboratoire de culture cellulaire. Des études montrent que des tests moins coûteux et d'une bonne efficacité peuvent être pratiqués, tel que le cost-effective and easy competitive enzyme linked immunosorbent assay (CEE-cELISA)(ARONTHIPPAITON, 2019). Cette technique est utilisée pour contrôler les anticorps post vaccinaux chez les chiens et l'humain, elle a montré de bons résultats en comparaison avec le test RFFIT tout en étant moins onéreuse, ne nécessitant pas l'utilisation de CVS ou de culture cellulaire (ARONTHIPPAITON, 2019).

- Le choix du type d'anticorps utilisé dans le traitement antirabique

Deux types d'anticorps sont utilisés pour combattre l'infection rabique après exposition, nous citons : les anticorps monoclonaux et les anticorps polyclonaux. Tous ces anticorps ont un même but celui de neutraliser le virus rabique avant que celui-ci n'atteigne le système nerveux.

Les anticorps polyclonaux sont les premiers à être utilisés en prophylaxie post exposition à la rage pendant des années et jusqu'à présent leur utilisation montre de bon résultats. Les anticorps antirabiques polyclonaux sont relativement faciles à produire, différentes espèces animales sont utilisées pour la production de ces anticorps avec un minimum de technologie et de main d'œuvre requise. Ce type d'anticorps possède une puissance de neutralisation élevée, un large spectre d'activité de neutralisation des virus, une large spécificité qui empêche la sélection de mutants d'échappement de neutralisation et de multiples fonctions effectrices, par l'intermédiaire de plusieurs isotopes, en raison de sa nature hétérogène(NAGARAJAN, 2014).

Les immunoglobulines antirabiques d'origine humaine (HRIG) sont mieux tolérées à ceux d'origine équine (ERIG) et sont idéalement utilisés dans tous les cas de prophylaxie post

exposition, sans contre-indication ni risque anaphylactique. Malheureusement, plus de 90% des cas de rage sont rencontrés dans les pays en développement où le HRIG n'est pas disponible et le ERIG reste la seule solution (MESLIN,1994) (NAGARAJAN, 2008).

L'Algérie utilise le ERIG, à notre connaissance aucune complication liée à ce dernier n'a été signalé jusqu'à présent (douleur osseuse, insuffisance rénale et encéphalopathie). Cela n'exclut pas l'existence de plusieurs échecs recensés à travers le monde. L'absence de production d'HRIG par l'IPA est certainement liée au prix coûteux de fabrication, sans oublier que la production d'anticorps d'origine humaine nécessite des donneurs humains indemnes de maladie virale tel que le HIV et les hépatites virales notamment B et C (NAGARAJAN et *al.* 2008).

D'autre part, l'utilisation des animaux (chevaux) peut ne pas respecter l'éthique, d'ailleurs plusieurs organisations luttent contre la production d'ERIG et la maltraitance des animaux.

La disponibilité des sérums antirabiques en Algérie est couverte par l'état, l'IPA représente une institution étatique. Lors d'exposition, les patients sont traités gratuitement aux niveaux des hôpitaux et polycliniques comme l'hôpital d'EL-KETAR est reconnu pour son service d'infectiologie et la disponibilité des sérums et vaccins antirabique. Plusieurs pays d'Afrique et l'Inde trouvent des difficultés d'utilisation de l'ERIG à cause de son coût élevé (Both et *al.* 2012). Des exemples pratiques pour montrer la différence du coût, à Bhoutan (situé dans l'est de la chaîne de l'Himalaya), le coût du traitement pour un adulte de 50 kg par le HRIG est estimé à 397,35 USD contre 19,07 USD pour l'ERIG (SPARROW et *al.* 2019).

Hormis le prix et la disponibilité qui peuvent être compromises, la variation d'un lot de sérum à l'autre est très probable ce qui peut affecter l'efficacité du produit. D'autres inconvénients des immunoglobulines dérivées du sang (d'origine humaine ou animal), est la durée de conservation relativement courte. De plus les immunoglobuline produite dans le sérum, de nature polyclonale, peuvent également inclure des anticorps non neutralisants ce qui peut affecter l'efficacité du sérum (SPARROW et *al.* 2019).

Une initiative de l'OMS encourage le développement des anticorps monoclonaux antirabiques pour la prophylaxie post exposition depuis le début des années 1990 à la suite d'une consultation menée avec des experts du Wistar à l'Institute de Philadelphie, aux États-Unis, en avril 1990 (Sparrow et *al.* 2019). Parmi, les raisons qui ont poussés les experts de passer de l'utilisation des RIG à celle des anticorps monoclonaux, est la peur d'une pénurie en RIG qui est non admissible vu l'importance et la gravité de la maladie. Malgré les difficultés liées à la production de ses anticorps, les avantages qu'ils procurent sont inestimable. Une

disponibilité illimitée avec une pureté et stabilité élevées, une spécificité à un seul épitope, et cela avec peu d'animaux requis, met la barre bien haute comparée au RIG. Si les avantages sont bien nombreux, ils en découlent plusieurs inconvénients. La technologie et les compétences requises pour les fabriquer est très coûteuse et demande des personnes qualifiées. Beaucoup plus de temps est mis en œuvre pour la production, en évoquant bien évidemment la nécessité d'en utiliser 2 ou 3 anticorps monoclonaux différents (un cocktail d'AC) pour viser d'autres épitopes ainsi maximiser les chances de neutralisation et éviter tout problème qui peut s'ensuivre à la spécificité. Par conséquent, il est souvent laborieux, onéreux et demande trop de temps pour identifier de multiples anticorps monoclonaux à spécificité convoitée.

Conclusion et perspective

Le nombre de décès en Algérie causé par le virus de la rage reste malheureusement remarquablement stable au cours des dernières années.

Notre travail met à disposition le processus de fabrication de sérum antirabique au sein de l'IPA. Ce sérum d'origine équin est récolté grâce à la méthode de plasmaphérèse depuis déjà quelques années puis purifié par les sulfates d'ammoniums à fin d'obtenir des fragments $F(ab')_2$ pour baisser l'immunogénicité des anticorps en se débarrassant du fragment Fc. Le test de contrôle réglementé par l'OMS pour titrer les anticorps neutralisants est représenté par le test RFFIT. Les résultats des lots que nous avons expertisés suite au test RFFIT étaient satisfaisants comparé au titrage du sérum de référence. Quoique ce test reste onéreux et laborieux d'où la baisse de production de sérum antirabique au sein de l'IPA.

En dépit des avancés scientifique, la prophylaxie sanitaire doit aussi être prise au sérieux. Les campagnes de vaccination en masse des animaux errants et des animaux sauvages dont jusqu'à présent nous ignorons leurs impacts épidémiologiques dans la transmission de la maladie. Des procédures doivent être prises avec prudence pour éviter les pertes humaines. La pandémie actuelle en 2020 du COVID 19 met en pause plusieurs travaux pas que ceux concernant la rage. D'après Les répondants de 82 pays, dont 14 avec des taux de couverture vaccinale inférieurs à 80% en 2019, ont signalé des perturbations dans les services de vaccination en raison du COVID-19 en mai 2020. Des conséquences dramatiques en cas de rupture pourrait subir le monde de nos jours et pas seulement à cause de la rage (WHO, 2020).

Des perspectives peuvent être envisagé afin d'améliorer le test RFFIT et envisager des tests moins couteux et qui demandent moins de temps pour augmenter la production de sérum antirabique en Algérie. Nous espérant avoir contribué avec les connaissances que nous avons récoltées au cours de cette étude dans l'évaluation de la technique de production de sérum antirabique à l'IPA ainsi que le titrage du sérum grâce au test RFFIT.

Références bibliographiques :

A

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

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

Albas, A., Pardo, P. E., Gomes, A. A., Bernardi, F., & Ito, F. H. (1998).Effect of a booster-dose of rabies vaccine on the duration of virus neutralizing antibody titers in bovines. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(4), 367-371

Antibody Basics Sigma-Aldrich. Consulté le 9 février 2020.
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antibody-basics.html>.

Astray, Renato Mancini, Soraia Attie Calil Jorge, et Carlos Augusto Pereira. 2017. « Rabies Vaccine Development by Expression of Recombinant Viral Glycoprotein ». *Archives of Virology* 162 (2): 323-32. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3128-9>.

Aronthippaitoon, et al. 2019.« A Cost Effective Easy Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Suitable for Monitoring Protective Immunity against the Rabies Virus in the Serum of Humans and Dogs ». *Japanese Journal of Infectious Diseases* 72 (2): 99-105. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2018.248>

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

B

BIOSYN Types of serum purification - Bio Synthesis Inc. Consulté le 16 novembre 2020. <https://www.biosyn.com/faq/types-of-serum-purification.aspx>.

Both, Leonard, Ashley C Banyard, Craig van Dolleweerd, Daniel L Horton, Julian K-C Ma, et Anthony R Fooks. 2012. « Passive Immunity in the Prevention of Rabies ». *The Lancet Infectious Diseases* 12 (5): 397-407. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70340-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70340-1).

Bourhy, Hervé, Laurent Dacheux, et Florence Ribadeau-Dumas. 2010a.

« L'immunothérapie antirabique passive d'hier et d'aujourd'hui ». *Biologie Aujourd'hui* 204 (1): 71-80. <https://doi.org/10.1051/jbio/2009049>.

C

CDC - ACIP Recommendations - Rabies 2019. 22 février 2019.

https://www.cdc.gov/rabies/resources/acip_recommendations.html

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

D

Dao, et al. 2006. Aspects épidémiologiques de la rage humaine et animale en milieu urbain à Bamako, Mali. *Bull Soc Pathol Exot* ; 99(3) :183–6

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

G

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

. **Garg, S. K. (2001).** Induction of immune responses in cattle with a DNA vaccine encoding glycoprotein C of bovine herpesvirus-1. *Veterinary Microbiology*, 78(4), 293-305. doi:10.1016/s0378-1135(00)00304-7

H

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

J

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

Juan C. Almagro. 2008. « Frontiers in Bioscience 13, 1619-1633, January 1, 2008 ». 2008. <https://www.bioscience.org/2008/v13/af/2786/fulltext.htm>.

L

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

M

Mes vaccins, Mon carnet de vaccination électronique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès ». s. d. Mon carnet de vaccination électronique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès. Consulté le 23 octobre 2020. <http://www.mesvaccins.net/>.

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

Mistretta, V I, E Cavalier, J Collette, et J P Chapelle. s. d. « Production des anticorps monoclonaux ». *Rev Med Liège*, 5.

N

Nagarajan, T., Charles E. Rupprecht, Scott K. Dessain, P. N. Rangarajan, D. Thiagarajan, et V. A. Srinivasan. 2008. « Human Monoclonal Antibody and Vaccine Approaches to Prevent Human Rabies ». In *Human Antibody Therapeutics for Viral Disease*, édité par Scott K. Dessain, 317:67-101. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-72146-8_3.

Nagarajan, Thirumeni, Wilfred E. Marissen, et Charles E. Rupprecht. 2014. « Monoclonal Antibodies for the Prevention of Rabies: Theory and Clinical Practice ». *AntibodyTechnology Journal*. 20 janvier 2014. <https://doi.org/10.2147/ANTI.S33533>.

P

Picard, J., Duchesne, C., Deshaies, D., Lambert L., Lavoie Y., Pouliot B. & Abdelaziz N., 2012. Guide d'intervention visant la prévention de la rage humaine. La direction des communications du ministère de la santé et des services sociaux. Québec. 219p.

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

Production Industrielle Des Anticorps 2018... News-Medical.Net. 28 octobre 2018.

[https://www.news-medical.net/life-sciences/Industrial-Production-of-Antibodies-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Industrial-Production-of-Antibodies-(French).aspx).

R

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

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

Rage animale : surveillance et contrôle ». Consulté le 23 octobre 2020.

<https://www.quebec.ca/agriculture-environnement-et-ressources-naturelles/sante-animale/maladies-animales/rage-chez-les-animaux/operations-de-surveillance-de-la-rage-du-raton-laveur/>

Ramakrishnan, MuthannanAndavar. 2016. « Determination of 50% endpoint titer using a simple formula ». *World Journal of Virology* 5 (2): 85-86. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>.

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

S

SMITH J.S., YAGER P.A. & BAER G.C. (1973). A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. WHO*, 48, 535–541.

Sparrow et al 2019. « Recent Advances in the Development of Monoclonal Antibodies for Rabies Post Exposure Prophylaxis: A Review of the Current Status of the Clinical Development Pipeline ». *Vaccine*, Scientific and Operational Updates on Rabies, 37 (octobre): A132-39. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.11.004>.

T

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

V

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

W

WHO, 2018. position April Rabies vaccines and immunoglobulins:

https://www.who.int/immunization/policy/position_papers/pp_rabies_summary_2018.pdf

WHO, 2020. and UNICEF Warn of a Decline in Vaccinations during COVID-19 ». s. d.
Consulté le 29 octobre 2020. <https://www.who.int/news/item/15-07-2020-who-and-unicef-warn-of-a-decline-in-vaccinations-during-covid-19>.

Wikipédia. **2020** « Anticorps »

<https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Anticorps&oldid=175663537>

Wikipédia,2020.CDR

https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=R%C3%A9gion_d%C3%A9terminant_la_compl%C3%A9mentarit%C3%A9&oldid=171653152.