

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE – ALGER**

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة – الجزائر

**MEMOIRE**

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE

**MAGISTER EN SCIENCES VETERINAIRES**

OPTION : **MICROBIOLOGIE MEDICALE VETERINAIRE**

**Thème**

**Mise au point de la technique d'immunodiffusion radiale (IDR)  
pour le contrôle de l'activité du vaccin antirabique tissulaire.  
Etude comparative avec le test des National Institutes of Health**

**Présenté par :**

**Mlle Mira Rima HADDOUM**

**Soutenu le 19 Mai 2014**

**Devant le jury composé de :**

<b>Pr. TEMIM S.</b>	Professeur	ENSV Alger	Présidente
<b>Dr. BRAHIMI M.</b>	Maitre de recherche	IPA Alger	Promoteur
<b>Dr. AIT OUDHIA Kh.</b>	Maitre de conférences	ENSV Alger	Examinatrice
<b>Dr. RAACHE R.</b>	Maitre de conférences	USTHB Alger	Examinatrice
<b>Dr. LOUNES N.</b>	Maitre assistante	ENSV Alger	Examinatrice

**Année universitaire 2013-2014**

## ***Remerciements***

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Production de vaccins et sérum antirabique de l'Institut Pasteur d'Algérie-Annexe de Kouba- sous la direction du Docteur ***Mahfoud BRAHIMI***.

Mes remerciements les plus chaleureux vont tout naturellement au Docteur ***Mahfoud BRAHIMI*** pour l'honneur qu'il m'a fait de proposer et d'encadrer ce travail, pour m'avoir accueillie dans son équipe, pour ses connaissances qu'il a su me faire partager, pour sa générosité et pour sa disponibilité. Qu'il trouve ici ma reconnaissance la plus sincère.

Mes plus vifs remerciements vont au Pr. ***Soraya TEMIM*** de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire pour l'honneur qu'elle nous fait d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Hommages respectueux.

Je remercie très respectueusement Dr. ***Khatima AIT OUDHIA*** de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Dr. ***Rachida RAACHE*** de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene et Dr ***Nedjma LOUNES*** de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, pour l'immense honneur qu'elles nous font d'examiner et de juger notre travail.

Je voudrais de la même façon remercier les nombreuses personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, notamment Mr ***Miliani DJEZZAR*** de l'université de Khemis Meliana et Mme ***Safia ZENIA*** de l'ENSV pour m'avoir guidé dans le traitement statistique des résultats ainsi que le Dr. ***IDRES***. Je remercie aussi l'ensemble du personnel du laboratoire de production de vaccins et sérum antirabique de l'IPA qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail, à commencer par Mr ***Abdelmalek BOUKHENFRA*** pour son aide, sa disponibilité et pour toutes les discussions constructives mais aussi Mrs ***Hmed KHORCHEF*** et ***Mohamed BOULAHLIB*** pour leur aide technique.

Je remercie également vivement tout le personnel de la bibliothèque de l'ENSV en particulier ***Yacine***.

Enfin, j'arrive aux remerciements qui me tiennent particulièrement à cœur, et pour cause, ceux que j'adresse à mes parents. Je vous remercie pour l'amour et la confiance que vous m'avez accordés, pour m'avoir permis de réaliser mes études dans les meilleures conditions et pour votre soutien durant cette période qui a été bien plus longue que prévue ! Ce travail vous ai donc dédié car votre contribution dans sa réussite est sans aucun doute, la plus importante.

***Mira Rima Haddoum***

## *Dédicaces*

### *Je dédie ce modeste travail*

*A mon adorable **maman**, pour son amour, ses sacrifices, ses précieux conseils, sa compréhension. Celle qui m'a toujours poussée à aller au-delà de mes limites pour réaliser mes projet, c'est sur ses pas que je marche, Je ne la remercierai jamais assez pour tout ce qu'elle a fait pour moi. Je t'aime que dieu te protège et te garde pour moi.*

*A mon **papa**, pour sa confiance, son aide et ses encouragements. Que dieu te protège et te préserve.*

*A mes très chères et bien aimées sœurs **Mounia** et **Leila** ainsi qu'à leurs maris **Yacine** et **Imad**.*

*A mon petit frère **Mohand Chérif**, je te souhaite un avenir plein de réussite et de sérénité.*

*A ma nièce adorée **Melissa** alias "**Bichette**", bienvenue dans la famille petite poupée.*

*A la mémoire de mon grand père "**Vava**", qui nous a quitté durant la préparation de ce travail, le souvenir de sa bonté restera gravé dans ma mémoire pour l'éternité.*

*A ma grand-mère "**Yemma**" Taazizt pour sa douceur et sa gentillesse.*

*A mes tantes et mes oncles pour leur soutien affectif **Houa**, **Nissa**, **Zahia**, **Hassiba**, **Mohand arab** et **Kamel**. Je n'oublierais pas mes cousines et cousins.*

*A ma grande sœur et tante adorée **Ghania**.*

*A mon fiancé **Mohamed**, Merci d'avoir été toujours à mes cotés dans les moments les plus difficiles, que Dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.*

*A ma belle famille.*

*A ma meilleure amie et troisième sœur **Chahrazed**, merci pour toutes ces belles années d'amitié et à son mari **Zakaria**.*

**Mira**

## **Résumé**

La technique d'immunodiffusion radiale (IDR) est l'une des méthodes *in-vitro* qui commence à se généraliser pour le contrôle des vaccins antirabiques inactivés *in process* et sur le produit fini. Dans cette étude, on se propose de mettre en place cette technique, au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie et de l'appliquer au contrôle de l'activité des vaccins antirabiques tissulaires inactivés. Une étude comparative des résultats obtenus a été réalisée avec le test des National Institutes of Health (NIH), test de référence à l'IPA, afin de mieux définir l'utilisation de cette technique.

Notre étude a porté sur soixante-dix-sept vaccins antirabiques tissulaires inactivés produits avec la souche virale Louis Pasteur Saigon (LPS). Pour les tests d'IDR, nous avons utilisé l'immun sérum hétérologue purifié IPA, qui est intégré dans la gélose à une concentration de 15µg/ml.

Les résultats obtenus par les deux techniques ont permis la classification des vaccins selon leurs valeurs antigéniques en 3 catégories (vaccins forts, moyens et faibles). La classification des vaccins selon les résultats de l'IDR a donné 44% de vaccins forts, 42% de vaccins moyens et 14% de vaccins faibles. À partir des résultats du test des NIH, la classification a donné 29% de vaccins forts, 52% de vaccins moyens et 19% de vaccins faibles. La comparaison des vaccins par paire entre les deux techniques NIH et IDR par la méthode d'Holm fait ressortir qu'il n'existe aucune différence significative entre les vaccins moyens et faibles des deux techniques, par contre une différence significative est observée entre les vaccins forts des deux techniques.

La fiabilité des résultats observés nous permet de suggérer la technique IDR dans le contrôle de l'activité des vaccins antirabiques tissulaires inactivés, ou du moins pour prédire les résultats du test des NIH, car peu coûteuse et fiable elle permet d'avoir une idée sur l'activité des vaccins en un temps très court, (96h maximum).

**Mots clés:** vaccin antirabique tissulaire inactivé, valeur antigénique, IDR, NIH

## **Abstract**

The radial immunodiffusion technique (RID) is one of the in-vitro methods which is beginning to become generalized for the control of rabies vaccines inactivated during production and on the finished product. In this study, we propose to implement this technique, at the Pasteur Institute of Algeria and apply it to control the activity of inactivated tissue rabies vaccines. A comparative study of the results was conducted with the test of the National Institutes of Health (NIH), the reference test to IPA, to better define the use of this technique.

Our studies is based on seventy seven inactivated tissue rabies vaccines, produced with the viral strain Louis Pasteur Saigon (LPS). For RID tests, we used a purified heterologous immune serum IPA, which is incorporated into the agar at a concentration of 15µg/ml.

The results obtained by the two techniques have been classified according to their antigenic values into 3 categories (strong vaccines, medium and low). The classification of vaccines according to the results of the RID gave 44% strong vaccines, 42% means vaccines and 14% of low vaccine. From the test results of NIH, the classification gave 29% strong vaccines, 52% means vaccines and 19% low vaccines. The vaccines comparison by pair between the two techniques NIH and RID by the Holm method revealed that there was no significant difference between the means vaccines and the lower vaccines for the two techniques. A significant difference is observed between the strong vaccines in the two techniques.

The reliability of the results obtained allow us to suggest the RID technique in controlling the activity of tissue inactivated rabies vaccines, or at least to predict the test results of NIH, because inexpensive and reliable it allows to have an idea about vaccine potency in a very short time (96 hours maximum).

**Keywords:** rabies tissular inactivated vaccine, antigenic value, RID, NIH.

## ملخص:

تقنية الانتشار المناعي الشعاعي (IDR) هي من إحدى الطرق الاصطناعية التي بدأت تتعمم لمراقبة نشاط لقاحات داء الكلب المعطلة خلال الإنتاج و على المنتج النهائي. في هذه الدراسة نقتراح تنفيذ هذه التقنية في معهد باستور بالجزائر وتطبيقها لمراقبة نشاط لقاحات داء الكلب النسيجي المعطل . تمت مقارنة النتائج المحصل عليها مع نتائج اختبار المعاهد الوطنية للصحة (NIH)، الاختبار المرجعي في معهد باستور بالجزائر وهذا لتقييم أفضل لاستخدام تقنية IDR .

تمت الدراسة على سبعة و سبعون دفعة من لقاحات داء الكلب المعطلة المنتوجه بسلالة الفيروسية لويس باستور سايغون (LPS) بالنسبة لتقنية IDR تم استخدام المصل المناعي المنقى المنتج في معهد باستور بالجزائر ، تم إدماجها في الأغار بتركيز 15µg/ml.

عبر النتائج المحصل عليها تم تصنيف اللقاحات حسب القيم الأنتيجينية إلى ثلاث فئات ( اللقاحات القوية ، المتوسطة و الضعيفة ). أعطى تصنيف اللقاحات حسب نتائج IDR : 44% من اللقاحات القوية، 42% من اللقاحات المتوسطة و 14% من اللقاحات الضعيفة. أما بالنسبة إلى نتائج اختبار NIH فالتصنيف أعطى 29% من من اللقاحات القوية، 52% من اللقاحات المتوسطة و 19% من اللقاحات الضعيفة . كشفت المقارنة بين التقنيتين NIH و IDR بطريقة Holm أنه لا يوجد فرق بين اللقاحات المتوسطة و الضعيفة بين التقنيتين، بينما يوجد فرق بين اللقاحات القوية بين التقنيتين.

موثوقية النتائج المحصل عليها تسمح لنا أن نقتراح تقنية IDR لمراقبة نشاط لقاحات داء الكلب المعطلة ، أو على الأقل لتنبؤ نتائج اختبار NIH لأن هذه التقنية غير مكلفة و موثوقة وتعطي فكرة عن فعالية اللقاحات في وقت قصير جدا ( 96 ساعة كأقصى حد ).

**الكلمات الدالة:** لقاح داء الكلب النسيجي المعطل ، القيمة الأنتيجينية، IDR ، NIH .

## Liste des abréviations

<b>Ac :</b>	Anticorps
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>Ag :</b>	Antigène
<b>Ag-Ac :</b>	Complexe antigène-anticorps
<b>ARN :</b>	Acide ribonucléique
<b>BPL :</b>	Beta propriolactone
<b>cm :</b>	Centimètre
<b>CVS :</b>	Challenge Virus Standard
<b>D<sup>2</sup> :</b>	Diamètre au carré
<b>DE<sub>50</sub> :</b>	Dose Efficace à 50%
<b>DL<sub>50</sub> :</b>	Dose létale à 50%
<b>ELISA :</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>ERA :</b>	Evelyn-Rokitnicki-Abelseth
<b>g :</b>	Gramme
<b>h :</b>	Heure
<b>HDCV :</b>	Human Diploid cell Vaccine
<b>HEP :</b>	High Egg Passage
<b>IC :</b>	Intra Cérébrale
<b>ICTV :</b>	International Committee on Taxonomy of Viruses
<b>IDR :</b>	Immunodiffusion radiale
<b>IF :</b>	Immunofluorescence
<b>IP :</b>	Intra Péritonéale
<b>IPA :</b>	Institut Pasteur d'Algérie
<b>IPK :</b>	Institut Pasteur d'Algérie- annexe de Kouba
<b>IS :</b>	Immun sérum
<b>KHI<sup>2</sup> :</b>	Khi deux
<b>LCR :</b>	Liquide céphalorachidien
<b>LEP :</b>	Low Egg Passage
<b>LPS :</b>	Louis Pasteur-Saigon
<b>MC :</b>	Matière Cérébrale
<b>mg :</b>	Milligramme
<b>ml :</b>	Millilitre
<b>mm :</b>	Millimètre
<b>MRLC :</b>	Maladie Réputée Légalement Contagieuse
<b>ng :</b>	Nano gramme
<b>NIH :</b>	National Institutes of Health
<b>NMRI :</b>	Naval Medical Research Institute

**OIE** : Office Internationale des Epizooties  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**PBS** : Phosphate Buffered saline  
**PCECV** : Purified Chick Embryo Cell Vaccine  
**PDEV** : Purified Duck Embryo Vaccine  
**pH** : Potential hydrogen  
**PM** : Pitman-Moore  
**PV** : Pasteur Virus  
**PVRV** : Purified Vero Rabies Vaccine  
**R<sup>2</sup>** : Coefficient de corrélation  
**RFFIT** : Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test  
**SAD** : Street Alabama Dufferin  
**SMBV** : Suckling Mouse Brain Vaccine  
**trs/min** : Tours par minute  
**UI** : Unité internationale  
**UV** : Ultra Violet  
**VA** : Valeur Antigénique  
**Vero** : Cellules épithéliales de rein de singe vert  
**VRG** : Vaccinia Recombinant Glycoprotein  
**WHO** : World Health Organization  
**µg** : Microgramme  
**µl** : Microlitre

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	: <i>Distribution mondiale de la rage (WHO, 2012).....</i>	<b>2</b>
<b>Figure 2</b>	: <i>Structure du virion (Dacheuxa et Bourhy, 2010).....</i>	<b>5</b>
<b>Figure 3</b>	: <i>Ultra-structure du virus rabique en microscopie électronique (Rotivel &amp; Goudal, 2007).....</i>	<b>5</b>
<b>Figure 4</b>	: <i>Cheminement du virus rabique dans l'organisme (traité de virologie médicale, ESTEM, 2003).....</i>	<b>8</b>
<b>Figure 5</b>	: <i>Cycle de réplication du virus rabique.....</i>	<b>9</b>
<b>Figure 6</b>	: <i>Représentation de la courbe de précipitation.....</i>	<b>28</b>
<b>Figure 7</b>	: <i>Principe de la technique d'Ouchterlony.....</i>	<b>31</b>
<b>Figure 8</b>	: <i>Double diffusion en milieu gélifié : Interprétation des lignes de précipités.....</i>	<b>32</b>
<b>Figure 9</b>	: <i>Principe de la technique de Mancini.....</i>	<b>33</b>
<b>Figure 10</b>	: <i>Lecteur de plaques IDR (IDRing® Plates).....</i>	<b>34</b>
<b>Figure 11</b>	: <i>Dispositif d'aspiration de la gélose pour créer les puits (Photo personnelle).....</i>	<b>40</b>
<b>Figure 12</b>	: <i>Puits disposés en doublets (Photos personnelle).....</i>	<b>40</b>
<b>Figure 13</b>	: <i>Dépôt des solutions d'Ag et d'Ac dans les puits en doublets (Photo personnelle)...</i>	<b>40</b>
<b>Figure 14</b>	: <i>Incubation des boites de Pétri à température ambiante (Photo personnelle).....</i>	<b>41</b>
<b>Figure 15</b>	: <i>Aspiration de la matière cérébrale de souriceaux témoins et ajout de la Kanamycine (Photos personnelles).....</i>	<b>44</b>
<b>Figure 16</b>	: <i>Broyage de la matière cérébrale avec du sable stérile (Photo personnelle).....</i>	<b>44</b>
<b>Figure 17</b>	: <i>Pot contenant les 3 phases après centrifugation (Photo personnelle).....</i>	<b>44</b>
<b>Figure 18</b>	: <i>Récolte de sang chez les souris (Photos personnelle).....</i>	<b>45</b>
<b>Figure 19</b>	: <i>Etapes de remplissage des cupules avec le mélange gélose/IS antirabique IPA (Photo personnelle).....</i>	<b>49</b>
<b>Figure 20</b>	: <i>Aspect de la plaque après perçage des puits centraux (Photo personnelle).....</i>	<b>50</b>
<b>Figure 21</b>	: <i>Préparation des dilutions des vaccins avec un tampon PBS (Photo personnelle)...</i>	<b>50</b>
<b>Figure 22</b>	: <i>Aspect de la plaque après dépôt des vaccins (Photo personnelle).....</i>	<b>50</b>
<b>Figure 23</b>	: <i>Formation des anneaux de précipitation (Allemand, 2008).....</i>	<b>51</b>
<b>Figure 24</b>	: <i>Résultat de la précipitation de l'IS antirabique IPA avec le virus LPS inactivé sans coloration (Photo personnelle).....</i>	<b>60</b>
<b>Figure 25</b>	: <i>Résultat de la précipitation de l'IS antirabique Butantan® avec le virus ERA vivant sans coloration (Photo personnelle).....</i>	<b>62</b>
<b>Figure 26</b>	: <i>Résultat de la précipitation de l'IS antirabique Butantan® avec le virus ERA vivant et inactivé après coloration (Photo personnelle).....</i>	<b>62</b>
<b>Figure 27</b>	: <i>Aspect d'un résultat négatif (Photo personnelle).....</i>	<b>66</b>
<b>Figure 28</b>	: <i>Aspect d'un résultat positif-Double anneau de précipitation (Photo personnelle)..</i>	<b>68</b>
<b>Figure 29</b>	: <i>Résultat de la précipitation du vaccin de référence S.122 après reconstitution de 4 flacons de vaccin (Photo personnelle).....</i>	<b>70</b>
<b>Figure 30</b>	: <i>Courbe d'étalonnage du vaccin de référence S.122 après reconstitution de 4 flacons.....</i>	<b>71</b>
<b>Figure 31</b>	: <i>Courbe d'étalonnage du vaccin de référence S.122 après reconstitution de 2 flacons.....</i>	<b>74</b>
<b>Figure 32a</b>	: <i>Moyenne et écart type des VA des trois catégories de vaccins dans le test des NIH</i>	<b>77</b>
<b>Figure 32b</b>	: <i>Variabilité des VA des trois catégories de vaccins dans le test des NIH.....</i>	<b>77</b>

<b>Figure 33a</b>	: <i>Moyenne et écart type des VA des trois catégories de vaccins reconfigurés dans le test des NIH.....</i>	<b>77</b>
<b>Figure 33 b</b>	: <i>Variabilité des VA des trois catégories de vaccins reconfigurés dans le test des NIH.....</i>	<b>77</b>
<b>Figure 34a</b>	: <i>Moyenne avec écart type des <math>DL_{50}</math> des trois catégories de vaccins dans le test des NIH.....</i>	<b>78</b>
<b>Figure 34b</b>	: <i>Variabilité des <math>DL_{50}</math> des trois catégories de vaccins dans le test des NIH.....</i>	<b>78</b>
<b>Figure 35a</b>	: <i>Corrélation entre les <math>DL_{50}</math> des vaccins forts.....</i>	<b>79</b>
<b>Figure 35b</b>	: <i>Corrélation entre les <math>DL_{50}</math> des vaccins moyens.....</i>	<b>79</b>
<b>Figure 35c</b>	: <i>Corrélation entre les <math>DL_{50}</math> des vaccins faibles.....</i>	<b>79</b>
<b>Figure 36</b>	: <i>Tendance des répartitions des VA et des <math>DL_{50}</math> des trois catégories de vaccins dans le test des NIH.....</i>	<b>79</b>
<b>Figure 37a</b>	: <i>Moyennes avec écart type des VA des trois catégories de vaccins dans le test d'IDR.....</i>	<b>80</b>
<b>Figure 37b</b>	: <i>Variabilité des VA des trois catégories de vaccins dans le test d'IDR.....</i>	<b>80</b>
<b>Figure 38a</b>	: <i>Moyennes avec écart types des VA des vaccins par NIH et IDR.....</i>	<b>82</b>
<b>Figure 38b</b>	: <i>Variabilité des VA des vaccins par NIH et IDR.....</i>	<b>82</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	: <i>Classification des Lyssavirus (WHO, 2013).....</i>	<b>4</b>
<b>Tableau 2</b>	: <i>Taux d'anticorps antirabiques après titrage par la technique RFFIT (Brahimi, 2013).....</i>	<b>6</b>
<b>Tableau 3</b>	: <i>Conduite de la vaccination avant exposition (Aubry &amp; Rotivel, 2001).....</i>	<b>13</b>
<b>Tableau 4</b>	: <i>Prophylaxie post-exposition recommandée en cas d'infection par le virus rabique (OMS, 2010).....</i>	<b>14</b>
<b>Tableau 5</b>	: <i>Volumes d'immun sérum antirabique IPA à incorporer dans la gélose à 1%.....</i>	<b>47</b>
<b>Tableau 6</b>	: <i>Volumes d'immun sérum antirabique IPA à incorporer dans la gélose à 2%.....</i>	<b>48</b>
<b>Tableau 7</b>	: <i>Tableau récapitulatif des vaccins testés par plaque de 12 cupules.....</i>	<b>55</b>
<b>Tableau 8</b>	: <i>Liste des vaccins testés par IDR avant contrôle par le test des NIH.....</i>	<b>56</b>
<b>Tableau 9</b>	: <i>Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique de l'IPA vis-à-vis des virus utilisés..</i>	<b>60</b>
<b>Tableau 10</b>	: <i>Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique Butantan<sup>®</sup> vis-à-vis des virus utilisés .....</i>	<b>61</b>
<b>Tableau 11</b>	: <i>Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique Vinrab<sup>®</sup> vis-à-vis du virus ERA.....</i>	<b>63</b>
<b>Tableau 12</b>	: <i>Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique Favirab<sup>®</sup> vis-à-vis du virus ERA.....</i>	<b>63</b>
<b>Tableau 13</b>	: <i>Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique SII<sup>®</sup> vis-à-vis des virus utilisés.....</i>	<b>63</b>
<b>Tableau 14</b>	: <i>Résultats du test de précipitation de la matière cérébrale de souriceaux témoins vis-à-vis des IS antirabiques IPA et Butantan<sup>®</sup> .....</i>	<b>64</b>
<b>Tableau 15</b>	: <i>Résultats des tests de précipitation des IS récoltés sur les souris hyperimmunisées.....</i>	<b>65</b>
<b>Tableau 16</b>	: <i>Résultats des différents volumes d'IS antirabique IPA incorporés dans la gélose à 1%.....</i>	<b>66</b>
<b>Tableau 17</b>	: <i>Résultats des différents volumes d'IS antirabique IPA incorporés dans la gélose à 2%....</i>	<b>67</b>
<b>Tableau 18</b>	: <i>Diamètres des anneaux de précipitation formés par le virus LPS inactivé.....</i>	<b>68</b>
<b>Tableau 19</b>	: <i>Diamètres des anneaux de précipitation formés par les vaccins S.135 et S.119.....</i>	<b>69</b>
<b>Tableau 20</b>	: <i>Diamètres des anneaux de précipitation formés par le vaccin de référence S.122.....</i>	<b>70</b>
<b>Tableau 21</b>	: <i>Paramètres du vaccin de référence S.122 retenus pour tracer la courbe d'étalonnage....</i>	<b>71</b>
<b>Tableau 22</b>	: <i>Diamètres des anneaux de précipitation des vaccins testés.....</i>	<b>72</b>
<b>Tableau 23</b>	: <i>Diamètres des anneaux de précipitation formés par les vaccins après reconstitution de un, deux et trois flacons de vaccins.....</i>	<b>73</b>
<b>Tableau 24</b>	: <i>Paramètres du vaccin de référence S.122 après reconstitution de 2 flacons retenus pour tracer la courbe d'étalonnage définitive.....</i>	<b>74</b>
<b>Tableau 25</b>	: <i>Diamètres des anneaux de précipitations et valeurs antigéniques des vaccins testés avant contrôle par le test des NIH.....</i>	<b>75</b>
<b>Tableau 26</b>	: <i>Nombre et pourcentage de vaccins classés par catégories selon les tests des NIH et IDR..</i>	<b>76</b>
<b>Tableau 27</b>	: <i>Comparaison des vaccins dans le test des NIH par le test de Newman-Keuls avec un intervalle de confiance de 95%.....</i>	<b>78</b>
<b>Tableau 28</b>	: <i>Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Dunnet / Test bilatéral.....</i>	<b>80</b>
<b>Tableau 29</b>	: <i>Comparaison des vaccins dans le test d'IDR par la méthode d'Holm.....</i>	<b>81</b>
<b>Tableau 30</b>	: <i>Comparaison des résultats des techniques NIH et IDR par paire selon la méthode d'Holm.....</i>	<b>82</b>

# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

## CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... 1-33

<b>1. GENERALITES SUR LA RAGE.....</b>	<b>1</b>
1.1. Définition de la rage.....	1
1.2. Epidémiologie de la rage.....	1
1.3. Eléments de virologie.....	3
1.3.1. Classification.....	3
1.3.2. Morphologie.....	4
1.4. Immunité antirabique.....	5
1.4.1. Immunité humorale.....	5
1.4.2. Immunité cellulaire.....	6
1.5. Etude de la maladie.....	6
1.5.1. Sources de l'infection et modes de transmission.....	6
1.5.2. Physiopathologie.....	7
1.5.3. Cycle de multiplication virale.....	8
1.5.4. Description de la maladie.....	9
1.5.4.1. Période d'incubation.....	9
1.5.4.2. Symptômes chez l'homme.....	9
1.5.4.3. Symptômes chez l'animal.....	10
1.6. Diagnostic.....	10
1.6.1. Identification de l'antigène rabique.....	10
1.6.2. Isolement du virus par inoculation à la souris.....	11
1.6.3. Isolement du virus par inoculation aux cultures cellulaires.....	11
1.6.4. Sérologie.....	11
1.7. Traitement.....	12
1.8. Prophylaxie.....	12
1.8.1. Prophylaxie sanitaire.....	12
1.8.2. Prophylaxie médicale.....	13
<b>2. LES VACCINS ANTIRABIQUES.....</b>	<b>15</b>
2.1. Définition de la vaccination.....	15
2.2. Définition d'un vaccin.....	15
2.3. Composition du vaccin antirabique.....	15
2.3.1. La souche vaccinale.....	15
2.3.2. L'antigène vaccinal.....	16
2.3.3. L'adjuvant.....	16
2.3.4. Résidus du processus de fabrication.....	16
2.3.5. Les conservateurs et les stabilisants.....	16
2.4. Différents types de vaccins antirabiques.....	17
2.4.1. Selon leur caractère vivant ou inactivé.....	17
2.4.1.1. Vaccins à virus vivants.....	17
2.4.1.2. Vaccins à virus inactivés.....	17
2.4.2. Selon leur mode de production.....	17
2.4.2.1. Vaccins produits sur encéphales d'animaux adultes.....	17

2.4.2.2.	Vaccins produits sur encéphales d'animaux nouveau-nés.....	17
2.4.2.3.	Vaccins produits sur embryon de canard.....	18
2.4.2.4.	Vaccins produits sur cultures cellulaires.....	18
2.4.2.5.	Vaccins produits par génie génétique.....	19
A.	Vaccins recombinants (VRG).....	19
B.	Vaccins à ADN.....	19
C.	Vaccins sous-unitaires.....	19
<b>3.</b>	<b>LES IMMUNOGLOBULINES RABIQUES.....</b>	<b>20</b>
<b>4.</b>	<b>CONTROLE DES VACCINS ANTIRABIQUES.....</b>	<b>21</b>
4.1.	Contrôle de la stérilité.....	21
4.2.	Contrôle du titre initial.....	21
4.3.	Contrôle de la stabilité.....	21
4.4.	Contrôle de l'innocuité.....	22
4.5.	Contrôle de l'activité.....	23
4.5.1.	Test de Habel.....	23
4.5.2.	Test des National Institutes of Health (NIH).....	23
4.5.3.	Test de la pharmacopée européenne.....	24
4.5.4.	Test d'hémmaglutination.....	25
4.5.5.	Test immuo-enzymatique ELISA.....	26
<b>5.</b>	<b>L'IMMUNODIFFUSION SUR GELOSE.....</b>	<b>27</b>
5.1.	Principe.....	27
5.2.	Impératifs de la réaction de précipitation.....	28
5.3.	Propriétés des gels.....	29
5.4.	Coloration des gels.....	30
5.5.	Intérêts des réactions de précipitation en milieu gélifié.....	30
5.6.	L'immunodiffusion double d'Ouchterlony.....	31
5.7.	L'immunodiffusion radiale de Mancini.....	33
	<b>REALISATION EXPERIMENTALE.....</b>	<b>36-81</b>
	<b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>36-58</b>
<b>1.</b>	<b>OBJECTIF DE L'ETUDE.....</b>	<b>36</b>
<b>2.</b>	<b>PERIODE ET LIEU DE L'ETUDE.....</b>	<b>36</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIELS.....</b>	<b>37</b>
3.1.	Matériels biologique.....	37
<b>4.</b>	<b>METHODES.....</b>	<b>39</b>
4.1.	Recherche des anticorps spécifiques dans les immuns sérums par la technique d'immunodiffusion double d'Ouchterlony.....	39
4.1.1.	Mode opératoire.....	39
4.1.1.1.	Préparation de la gélose.....	39
4.1.1.2.	Dépôt des solutions d'antigènes et d'anticorps - incubation.....	40
4.1.1.3.	Lecture des résultats.....	41

4.1.1.4.	Coloration des géloses.....	41
4.1.2.	Tests de précipitation des immuns sérums antirabiques purifiés.....	42
4.1.2.1.	Test de précipitation de l'immun sérum antirabique IPA vis-à-vis de divers virus.....	42
4.1.2.2.	Test de précipitation de l'immun sérum antirabique Butantan <sup>®</sup> vis-à-vis de divers virus.....	42
4.1.2.3.	Test de précipitation de l'immun sérum antirabique Vinrab <sup>®</sup> vis-à-vis du virus ERA.....	42
4.1.2.4.	Test de précipitation de l'immun sérum antirabique Favirab <sup>®</sup> vis-à-vis du virus ERA.....	43
4.1.2.5.	Test de précipitation de l'immun sérum antirabique SII <sup>®</sup> vis-à-vis de divers virus.....	43
4.1.2.6.	Test de précipitation de la matière cérébrale de souris témoins.....	43
4.1.2.7.	Test de précipitation de sérums récoltés sur des souris hyperimmunisées....	44
4.2.	Détermination de la valeur antigénique des vaccins par la technique d'immunodiffusion radiale de Mancini.....	45
4.2.1.	Choix des produits utilisés.....	45
4.2.2.	Mise au point de la technique.....	46
4.2.2.1.	Détermination de la quantité d'immun sérum antirabique IPA à incorporer dans la gélose à 1%.....	46
4.2.2.2.	Détermination de la quantité d'immun sérum antirabique IPA à incorporer dans la gélose à 2%.....	47
4.2.2.3.	Détermination du nombre de flacons de vaccins à reconstituer.....	48
4.2.3.	Mode opératoire.....	48
4.2.3.1.	Préparation de la gélose à 2%.....	48
4.2.3.2.	Dépôts des vaccins et incubation.....	50
4.2.3.3.	Lecture des résultats.....	51
4.2.3.4.	Coloration des géloses.....	51
4.2.4.	Tests d'immunodiffusion radiale.....	51
4.2.4.1.	Test IDR du virus LPS inactivé.....	52
4.2.4.2.	Test IDR de deux lots de vaccins antirabiques tissulaires inactivés.....	52
4.2.4.3.	Test IDR du vaccin de référence.....	52
4.2.4.4.	Etablissement de la courbe d'étalonnage.....	52
4.2.4.5.	Test IDR d'un premier groupe de vaccins.....	53
4.2.4.6.	Test IDR avec un, deux et trois flacons de vaccins reconstitués.....	53
4.2.4.7.	Test IDR des différents vaccins antirabiques tissulaires inactivés.....	54
4.2.4.8.	Test IDR d'un groupe de vaccins avant contrôle par le test des NIH.....	56
4.3.	Test des national institutes of health (NIH).....	56
4.4.	Classification des vaccins.....	58
4.5.	Traitement des données.....	58

**CHAPITRE III : RESULTATS..... 59-81**

<b>1. Résultats des tests de précipitation pour la recherche des anticorps spécifiques dans les immuns sérums par la technique d'immunodiffusion double d'Ouchterlony.....</b>	<b>59</b>
1.1. Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique IPA vis-à-vis des virus utilisés.....	59
1.2. Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique Butantan <sup>®</sup> vis-à-vis des virus utilisés.....	61
1.3. Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique Vinrab <sup>®</sup> vis-à-vis du virus ERA.....	63
1.4. Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique Favirab <sup>®</sup> vis-à-vis du virus ERA.....	63
1.5. Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique SII <sup>®</sup> vis-à-vis des virus utilisés.....	63
1.6. Résultats du test de précipitation de la matière cérébrale des souriceaux témoins.....	64
1.7. Résultats du test de précipitation des sérums récoltés sur les souris hyperimmunisées.....	64
<b>2. Résultats des tests de précipitation utilisés dans la détermination de la VA des vaccins par la technique d'immunodiffusion radiale de Mancini.....</b>	<b>65</b>
2.1. Résultats des tests nécessaires à la détermination de la quantité d'IS antirabique IPA à incorporer dans la gélose à 1%.....	65
2.2. Résultats des tests nécessaires à la détermination de la quantité d'IS antirabique IPA à incorporer dans la gélose à 2%.....	67
2.3. Résultats du test IDR du virus LPS inactivé.....	68
2.4. Résultats du Test IDR de deux lots de vaccins antirabiques tissulaires inactivés.....	69
2.5. Résultats du test IDR du vaccin de référence.....	69
2.6. Etablissement de la courbe d'étalonnage.....	70
2.7. Résultats du test IDR d'un groupe de vaccins.....	71
2.8. Résultats du test IDR avec un, deux et trois flacons de vaccins reconstitués.....	72
2.9. Etablissement de la nouvelle courbe d'étalonnage.....	73
2.10. Résultats du test IDR des différents vaccins antirabiques tissulaires inactivés.....	74
2.11. Résultats du test IDR d'un groupe de vaccins avant contrôle par le test des NIH.....	75
<b>3. Résultats des tests des NIH.....</b>	<b>75</b>
<b>4. Analyse des résultats et traitement des données.....</b>	<b>75</b>
4.1. Classification des vaccins.....	75
4.2. Variabilité et profils des vaccins dans le test des NIH.....	76
4.2.1. Variabilité et comparaison des VA des vaccins dans le test des NIH.....	76
4.2.2. Variabilité et comparaison des DL <sub>50</sub> des vaccins dans le test des NIH.....	78
4.2.3. Répartition et dépendance entre VA et DL <sub>50</sub> des vaccins dans le test des NIH.....	79
4.3. Variabilité et profils des vaccins dans le test d'IDR.....	80
4.4. Comparaison des résultats des deux tests NIH et IDR.....	81

**CHAPITRE IV : DISCUSSION..... 83**

**CHAPITRE V : CONCLUSION..... 92**

**Références bibliographie**

**Annexes**

# **Introduction**

La rage est une maladie connue depuis la plus haute antiquité, c'est une anthroponose, qui peut affecter tous les animaux à sang chaud, à la fois réservoirs et vecteurs du virus rabique. Elle se traduit par une encéphalomyélite à issue fatale dont les agents étiologiques sont regroupés au sein du genre *Lyssavirus* (Acha et Szyfres, 2001). En effet, une fois les symptômes déclarés, la rage est quasiment toujours mortelle, aucun traitement n'étant réellement efficace.

De nos jours, la rage continue encore de tuer plus de 55 000 personnes dans le monde chaque année et les vaccins antirabiques représentent la ressource la plus importante qui soit disponible pour la prévention et le "traitement" des personnes exposées à la rage.

Bien qu'elle soit l'une des maladies les plus anciennement connues et le vaccin antirabique l'un des premiers à être découvert, les recherches en matière de vaccination contre cette maladie n'ont pratiquement jamais cessé. La production de vaccins antirabiques pour usage humain et vétérinaire a connue énormément de progrès, ainsi que les techniques utilisées pour le contrôle de la qualité de ces vaccins.

Chaque vaccin produit doit répondre à plusieurs paramètres de qualité dont l'activité protectrice. L'appréciation de cette activité protectrice des vaccins est d'une grande importance car elle permet d'évaluer le degré d'efficacité de ces derniers.

Les méthodes utilisées pour connaître le pouvoir protecteur des lots de vaccins produits qu'ils soient à usage humain ou vétérinaire, consistent à vacciner des souris puis à les mettre en contact avec un virus vivant (virus d'épreuve). L'inconvénient de ces techniques est qu'elles nécessitent un grand nombre d'animaux de laboratoire, de plus elles provoquent des douleurs et une détresse intense chez l'animal. Aussi, ces dernières années, sur la base de la règle des *Trois R* (Raffinement, Réduction et Remplacement) et sous les recommandations de l'OMS, les laboratoires qui travaillent sur les vaccins antirabiques ont essayé de mettre en place un test *in-vitro* pour le contrôle des vaccins antirabiques inactivés produits sur culture cellulaire qui pourrait éventuellement remplacer le test des National Institutes of Health (NIH). C'est ainsi que le test d'immunodiffusion radiale a été utilisé pour le contrôle *in process* des vaccins antirabiques cellulaires.

Ce test a été utilisé pour la première fois en 1975 pour la détermination des antigènes inactivés dans les vaccins contre le virus de la grippe (Schild et *al*, 1975). Plus tard, en 1982,

Ferguson et Schild, ont été les premiers à l'utiliser pour le dosage des vaccins antirabiques produits sur culture cellulaire. En ce qui concerne les vaccins antirabiques produits sur cerveaux de souris (vaccin tissulaire) et à notre connaissance, l'immunodiffusion radiale n'a pas été appliquée.

Au cours de ce travail, nous avons essayé de voir si cette technique pourrait s'appliquer au vaccin tissulaire inactivé de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) et comment pourrait-on l'utiliser pour estimer l'activité de ce type de vaccin sur le produit fini. C'est ainsi que nous nous sommes proposés de mettre en place cette technique d'immunodiffusion radiale au niveau du laboratoire de Production de Vaccins et Sérum Antirabique de l'IPA, d'apprécier son éventuelle utilisation dans le contrôle des vaccins antirabiques inactivés tissulaires et peut être arriver ainsi à remplacer le test des NIH qui est d'usage au niveau du laboratoire.

Une étude comparative avec le test des NIH a été menée de manière à apprécier l'efficacité de l>IDR par rapport au test des NIH (test standard couramment utilisé dans le cadre du contrôle des différents lots de vaccins produits en Algérie).

# **Chapitre I**

## **Etude bibliographique**

## **1. GENERALITES SUR LA RAGE**

### **1.1.Définition de la rage**

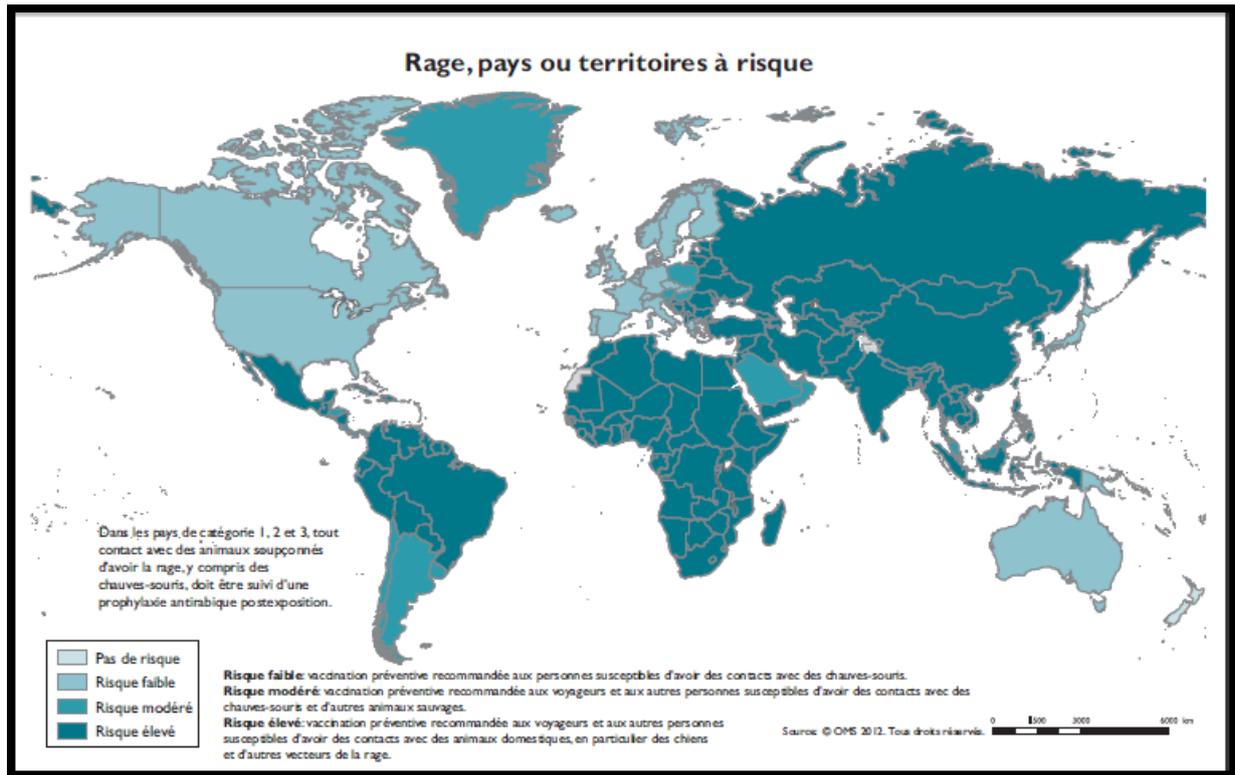
La rage est une maladie infectieuse, virulente, inoculable généralement par morsure (Lepine & Gamet, 1969), elle est due à plusieurs virus du genre Lyssavirus qui présentent un tropisme important pour les cellules nerveuses. La rage est transmissible accidentellement à l'homme, généralement à la suite d'une morsure par un animal enragé et entraîne presque toujours une mort rapide (Bourhy, 2003).

Cliniquement, la rage se caractérise par une longue période d'incubation et par une encéphalomyélite mortelle, elle est le plus souvent accompagnée par des signes d'excitation, d'agressivité ou de paralysie (ENVF, 1990). Histologiquement, la rage se caractérise par la présence d'inclusions cytoplasmiques éosinophiles dans certaines cellules nerveuses « corps de Negri » (Rossister & Jackson, 2007).

### **1.2.Epidémiologie de la rage**

C'est une zoonose majeure, classée comme une maladie réputée légalement contagieuse (MRLC), tous les cas de rage humaine sont d'origine animale, exceptés les rares cas de transmission interhumaine à la suite d'une greffe d'organe ou de cornée. Lorsqu'elle est déclarée cliniquement chez l'homme, la rage est toujours mortelle après une évolution relativement courte et un tableau clinique dramatique au cours duquel la conscience est conservée jusqu'à une phase avancée.

La maladie sévit dans plus de 100 pays et territoires, son contrôle reste une des priorités de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Figure 1). Plus d'un siècle après la découverte de la vaccination antirabique, on estime que la rage est encore à l'origine d'environ 55 000 décès par an dont 24 000 en Afrique (WHO, 2005). Ce chiffre ne semble pas évoluer favorablement, au contraire, la rage semble même ré-émerger dans certaines parties du monde (c'est le cas en Chine, au Vietnam et dans certaines parties d'Afrique). La raison est due à une absence de prise en charge efficace par les autorités de santé publique humaine et vétérinaire. Selon l'OMS, ce chiffre place la rage au 10<sup>ème</sup> rang des maladies infectieuses mortelles.



**FIGURE 1 : Distribution mondiale de la rage (WHO, 2012)**

En Algérie, la rage humaine est toujours présente avec toutefois certaines régions qui sont relativement épargnées (régions du sud). 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 (Benhabyles, 2008). Les régions du nord semblent être les plus atteintes (INSP, 2011).

La répartition géographique des cas de rage animale est identique à celle de la rage humaine pour cause les animaux sont responsables des contaminations particulièrement le chien suivi du chat et enfin du bovin (Benhabyles, 2008).

Le chien représente la principale espèce animale réservoir et vectrice dans le monde, il est à l'origine d'environ 99 % des décès humains et menace potentiellement plus de 3,3 milliards de personnes. Cependant de très nombreuses autres espèces de mammifères jouent le rôle de réservoirs. Elles appartiennent à deux ordres : celui des carnivores (renard, mouffette, mangouste par exemple) et celui des chiroptères (chauves-souris hématophages, insectivores et frugivores). A chacun de ces réservoirs correspond un variant particulier de Lyssavirus. En dehors de ces réservoirs, la plupart des espèces de mammifères sont sensibles aux Lyssavirus et peuvent donc constituer des vecteurs de l'infection chez l'homme.

### **1.3.Eléments de virologie**

#### **1.3.1. Classification**

Selon la classification établie par le Comité International de Taxonomie des Virus (CITV), les virus rabiques appartiennent :

- à l'ordre des *Mononegavirales*, qui regroupe les virus de structure hélicoïdale dont le génome est un ARN monocaténaire non segmenté, de polarité négative et donc non infectieux.
- à la famille des *Rhabdoviridae* en raison de leur morphologie "en baguette" (du grec *rhabdos*). Cette famille est composée d'une centaine de virus de mammifères, poissons, crustacés, reptiles, insectes et de végétaux.
- au genre *Lyssavirus* (du grec *lyssa*: « folie ») du fait de leur neuropathogénie.

Au sein de ce genre, sept génotypes différents peuvent être distingués, le génotype 1 comprend les souches du virus rabique qui sont les plus préoccupants tant par leur nombre que par leur répartition géographique quasi mondiale (Johnson et *al.*, 2010a).

On dénombre actuellement 15 espèces de lyssavirus classifiées ou en cours de classification (Tableau 1). La principale pourvoyeuse de la rage humaine est de loin l'espèce RABV également responsable de la rage canine (Suwansrinon et *al.*, 2006 & WHO, 2013).

**TABLEAU 1 : Classification des Lyssavirus (WHO 2013)**

<b>Espèces</b>	<b>Abréviations</b>	<b>Origine géographique</b>	<b>Vecteurs connus</b>	<b>Autres hôtes sensibles connus</b>
<b>Virus de la rage</b>	RABV (génotype 1)	Mondiale	Carnivores au niveau mondial, chauves-souris en Amérique	Nombreux animaux (dont l'homme)
<b>Virus Duvenhage</b>	DUVV (génotype 4)	Afrique du sud, Kenya, Zimbabwe	Chauves-souris insectivores	Homme
<b>Lyssavirus des chauves-souris européennes type 1</b>	EBVL-1 (génotype 5)	Europe	Chauves-souris insectivores ( <i>Eptesicus serotinus</i> )	Homme (Ukraine et Russie), moutons (Danemark), fouine (Allemagne), chat (France)
<b>Lyssavirus des chauves-souris européennes type 2</b>	EBVL-2 (génotype 6)	Europe	Chauves-souris insectivores ( <i>Myotis sp</i> )	Homme (Royaume-Unis et Finlande)
<b>Lyssavirus des chauves-souris australiennes</b>	ABLV (génotype 7)	Australie	Chauves-souris frugivores/insectivores	Homme
<b>Virus Lagos bat</b>	LBV (génotype 2)	Afrique Sub-saharienne	Chauves-souris frugivores ( <i>Megachiroptera</i> )	Chiens et chats
<b>Virus Mokola</b>	MOKV (génotype 3)	Afrique Sub-saharienne	Inconnu	Musaraignes, chiens, chats et homme
<b>Virus Aravan</b>	ARAV	Asie Centrale	Chauves-souris insectivores ( <i>Myotis blythi</i> )	
<b>Virus Khudjand</b>	KHUV	Asie Centrale	Chauves-souris insectivores ( <i>Myotis mystacinus</i> )	-
<b>Virus Irkut</b>	IRKV	Sibérie de l'Est	Chauves-souris insectivores ( <i>Murina leucogaster</i> )	-
<b>Virus West-Caucasian bat</b>	WCBV	Caucase	Chauves-souris insectivores ( <i>Miniopterus schreibersi</i> )	-
<b>Virus Ozernoe*</b>	-	Russie centrale	Chauves-souris	Homme
<b>Virus Shimoni bat*</b>	SHIBV	Kenya	Chauves-souris ( <i>Hipposideros commersoni</i> )	-
<b>Virus Bokeloh bat*</b>	BBLV	Allemagne	Chauves-souris ( <i>Myotis nattereri</i> )	-
<b>Virus Ikoma*</b>	I KOV	Afrique	Civette	-

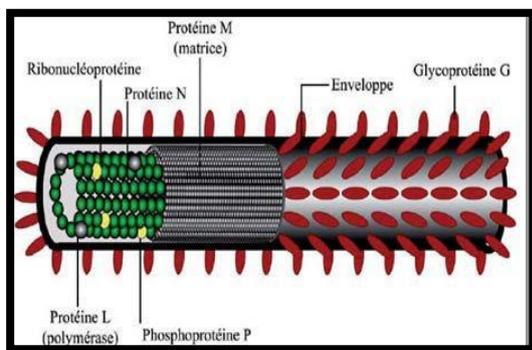
\* : En cours de classification

### 1.3.2. Morphologie

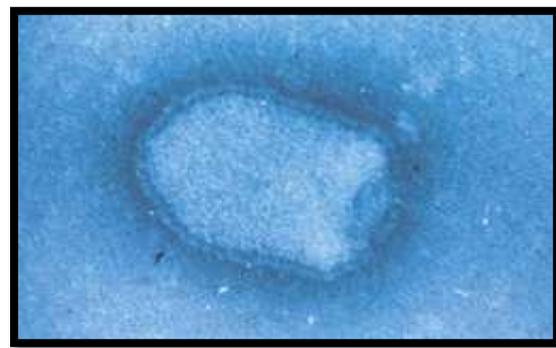
Le virus rabique est un virus enveloppé présentant en microscopie électronique une forme d'obus. La taille des virions est d'environ 100-300 nm de long sur 75 nm de diamètre. Ces virions sont constitués d'une nucléocapside centrale de symétrie hélicoïdale entourée d'une enveloppe lipidique empruntée à la cellule lors du bourgeonnement (Figure 2).

L'enveloppe composée d'un double feuillet phospholipidique entoure tout le virion. Elle comporte deux protéines d'origine virale, la glycoprotéine G et la protéine de matrice M. La glycoprotéine G, en position transmembranaire, s'associe sous forme de trimères pour constituer des spicules donnant au virus son aspect hérissé en microscopie électronique (Figure 3). La protéine M forme un manchon entre l'enveloppe et la nucléocapside virale.

La nucléocapside est constituée de l'ARN génomique (environ 12 000 nucléotides) associé à trois protéines virales : la nucléoprotéine N, l'ARN polymérase ARN dépendante L et la phosphoprotéine P. La protéine N est étroitement liée à l'ARN sur la totalité de sa longueur. Les protéines P et L ont un rôle fonctionnel important dans les phénomènes de transcription et de réplication du génome viral (Delmas, 2008).



**FIGURE 2: Structure du virion**  
(Dacheux et Bourhy, 2011)



**FIGURE 3 : Ultra-structure du virus rabique en microscopie électronique**  
(Rotivel et Goudal, 2007)

## 1.4. Immunité Antirabique

### 1.4.1. Immunité humorale

La glycoprotéine d'enveloppe G, responsable de la production d'anticorps neutralisants, possède un rôle fondamental dans l'immunité antirabique humorale. Cette glycoprotéine peut être isolée et purifiée. A titre expérimentale (lors d'une épreuve virulente), la glycoprotéine G permet à elle seule une bonne protection contre la rage. La protéine de la nucléocapside N est, dans certains cas, capable d'induire elle aussi une réponse immunitaire protectrice.

Un travail avec le Baculovirus chez la souris a montré qu'une meilleure immunité est retrouvée avec la glycoprotéine G lorsqu'elle est associée à la protéine de la nucléocapside N

au moment de la primo vaccination et du rappel, comme le montre le tableau 2 (Brahimi, 2013, publication en cours).

**TABLEAU 2 : Taux d'anticorps antirabiques après titrage par la techniques RFFIT (UI/ml)**

Primo vaccination J0	Rappel J7	Saignée J 15	Taux d'anticorps (UI/ml) en fonction des dilutions			
			1/5	1/25	1/125	1/625
N	G+N	/	13	2,83	00	0,74
G+N	G	/	71	27	5	4,61
G+N	N	/	19,30	20	7	2,81
G+N	G+N	/	3,69	4,60	98	37

En pratique, le titrage des anticorps neutralisants synthétisés en réponse à la présence de la glycoprotéine d'enveloppe rabique permet d'estimer le degré d'immunité chez les sujets en cours de traitement antirabique ou vaccinés préventivement (Toma, 2008).

#### **1.4.2. Immunité cellulaire**

L'immunité cellulaire joue certainement un rôle complémentaire de l'immunité humorale dans les mécanismes de protection et dans les phénomènes immuno-pathologiques. Le virus rabique, vivant ou inactivé, entraîne une importante production d'interféron gamma par les cellules T.

Une production massive d'interféron gamma suite à une vaccination antirabique indique donc qu'une réponse cellulaire a bien eu lieu (la production d'interféron gamma étant précoce) et permet ainsi d'évaluer la capacité des patients vaccinés à contrôler l'infection lors de vaccination post-exposition (Lambot et *al.*, 2000).

#### **1.5. Etude de la maladie**

##### **1.5.1. Sources de l'infection et modes de transmission**

Le virus de la rage a une survie limitée à l'extérieur de son hôte. Plusieurs facteurs environnementaux peuvent en influencer la durée en inactivant le virus : la dessiccation, la lumière du soleil (UV), la chaleur (Rupprecht et *al.*, 2004), les rayons X, les détergents et un pH de moins de 3 et de plus de 11 en sont des exemples (Bleck et *al.*, 2000).

La transmission du virus se fait essentiellement par la salive, voire par le liquide lacrymal, d'un animal atteint, malade ou en incubation de la maladie. La contamination a lieu

dans la quasi-totalité des cas à l'occasion d'une morsure ou d'une griffure du tissu musculaire ou du derme.

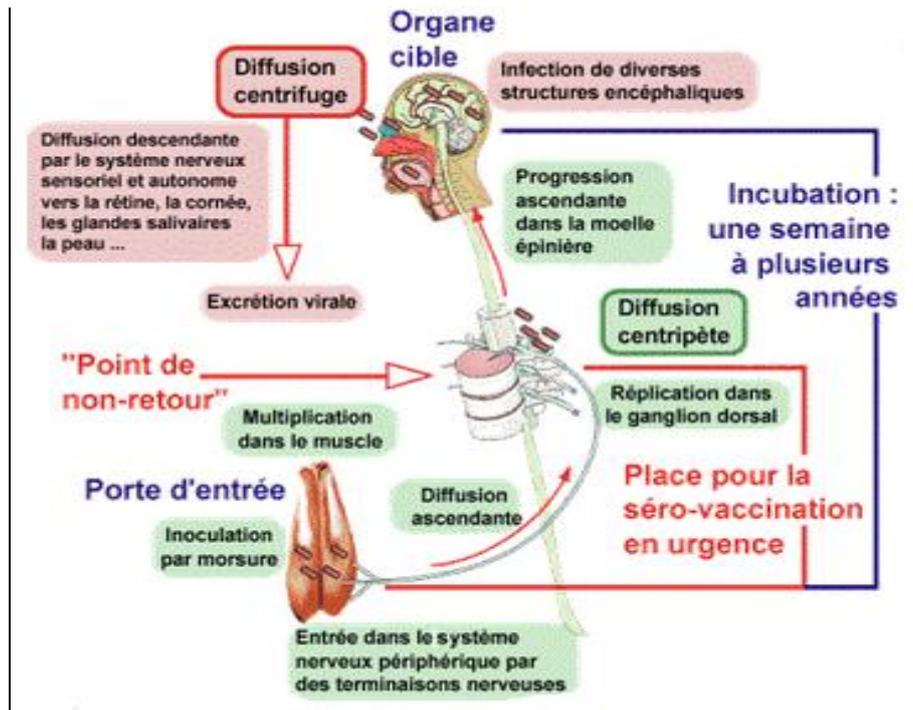
D'autres modes de contamination, bien moins fréquents sont possibles comme le léchage de plaie ou de muqueuse saine, le contact avec la peau lésée et de façon exceptionnelle par inhalation d'un aérosol de virus (Childs & Real, 2007). Sept cas de contamination à la suite de greffes d'organes ont été décrits en 2004 et 2005 aux Etats Unis et en Allemagne et huit cas à la suite de greffe de cornée.

L'homme étant un cul-de-sac épidémiologique, la transmission d'homme à homme d'une façon naturelle ne peut se faire, toute fois deux cas de transmission par morsure et par exposition des muqueuses à de la salive humaine infectée ont été suspectés en Ethiopie (Fedaku et *al.*, 1996).

### **1.5.2. Physiopathologie**

Après introduction dans l'organisme, le virus de la rage se multiplie localement au site d'inoculation dans les myocytes, puis il se propage dans l'organisme en cheminant dans les neurones par voie axonale centripète, le virus gagne ainsi le cerveau (en particulier l'hippocampe et le lobe temporal) où il se multiplie massivement dans les neurones (Warrell & Warrell, 2004), puis il regagne par voie axonale centrifuge des organes préférentiels (Figure 04). D'importantes doses virales sont alors retrouvées au niveau des glandes salivaires mais aussi des muqueuses ainsi que dans d'autres organes comme les yeux et les reins.

Le virus de la rage a une forte affinité pour les zones du cerveau impliquées dans le comportement, il induit souvent un comportement agressif chez l'animal ou la personne contaminée. Les modifications comportementales liées à cette infection contribuent fortement à la transmission du virus puisque l'animal contaminé, devenu enragé, va lui-même disséminer le virus à un autre hôte par morsure.

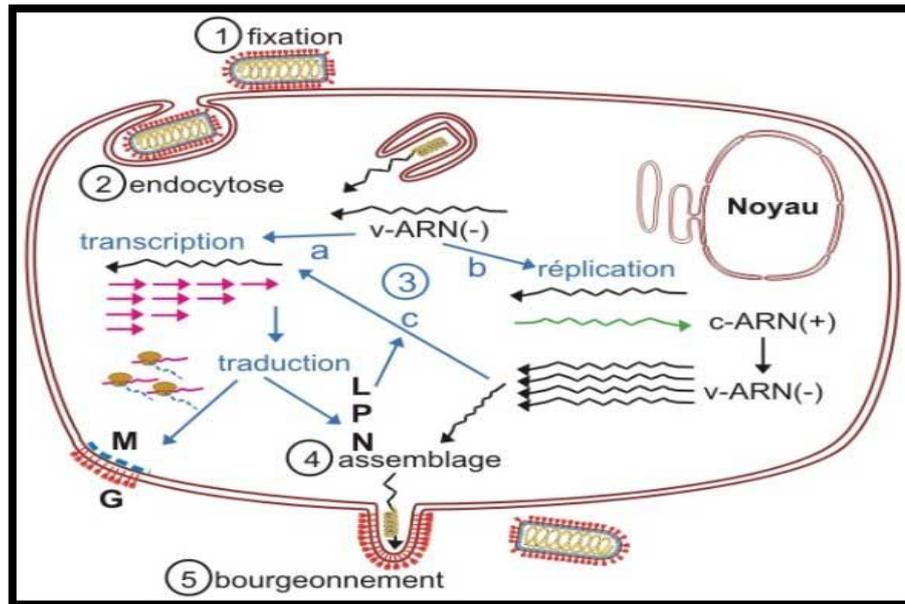


**FIGURE 4 : Cheminement du virus rabique dans l'organisme**  
(Traité de virologie médicale, ESTEM, 2003)

### 1.5.3. Cycle de multiplication virale

Le cycle viral des Rhabdovirus se déroule entièrement dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'infection virale débute par la fixation du virus sur les cellules hôtes, les spicules de la glycoprotéine G se lient aux récepteurs cellulaires ce qui induit l'internalisation du virus par endocytose. Les récepteurs cellulaires peuvent être de nature protéique ou fibroblastique (tissus musculaires, glandulaires, cutanés et nerveux). *In-vivo*, le virus de la rage a un tropisme marqué pour les neurones où trois récepteurs de nature protéique sont présents, ils peuvent agir seuls ou de façon conjointe : le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, le récepteur à basse affinité du Nerve Growth Factor ou NGF et le récepteur NCAM (Neural Cell adhesion Molecule)

L'étape suivante est la multiplication virale, la transcription et la réplication de l'ARN viral sont assurées par l'ARN polymérase ARN dépendante-phosphoprotéine, les ARN ainsi synthétisés vont servir de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes viraux. Les ARN viraux néoformés associés à la nucléocapside et à l'ARN polymérase virale sont déplacés vers la membrane cytoplasmique (Figure 05), de nouvelles particules virales compactes sont formées et bourgeonnent hors des cellules hôtes (Banerjee, 1987).



**FIGURE 5** : Cycle de réplication du virus rabique  
([www.microbe-edu.org/](http://www.microbe-edu.org/))

#### 1.5.4. Description des signes cliniques

##### 1.5.4.1. Période d'incubation

Sur le plan clinique, l'incubation est totalement silencieuse et sa durée est variable au sein de chaque espèce. Elle est fonction de la souche virale, de la quantité de virus inoculée, du statut immunitaire du sujet mordu et du siège de la morsure. Chez l'homme dans 85 % des cas l'incubation dure entre 35 et 90 jours. Chez le chien et le chat, elle est en moyenne un peu plus courte de 15 à 60 jours et chez les bovins elle dure de 1 à 3 mois (Toma, 2008).

Des morsures graves et multiples à la tête et au cou ou des morsures à des sites très innervés peuvent rendre la période d'incubation plus courte (Charlton, 1994).

##### 1.5.4.2. Symptômes chez l'homme

Les prodromes sont variés et peu spécifiques : céphalées, fièvre, douleur laryngées, le plus évocateur (50-80% des cas) reste la douleur et le prurit au siège de la morsure. Par la suite, c'est la phase d'état qui s'installe, elle est caractérisée par une encéphalomyélite, elle débute par une dysphagie et des troubles neuropsychiatriques variés et des spasmes phobiques (hydrophobie, aérophobie) (OIE, 2005). L'évolution des symptômes neurologiques se fait vers le coma, survient ensuite la mort en quelques jours.

D'autres personnes présentent au contraire une forme paralytique, au cours de laquelle la mort survient plus tardivement, par paralysie respiratoire (Toma, 2008).

### **1.5.4.3.Symptômes chez l'animal**

Les signes initiaux de rage chez l'animal ne sont pas spécifiques et incluent : anorexie, léthargie, fièvre, dysphagie, vomissements. Des modifications de la phonation sont aussi observées précocement dans la maladie. La rage évolue en deux types de syndrome : la rage furieuse et la rage paralytique dite « muette ». Il n'est pas toujours évident, en début de maladie, de faire la distinction entre ces deux formes.

Dans la rage furieuse, l'animal peut devenir hypersensible à des stimuli auditifs, visuels ou tactiles, il semble avoir des hallucinations, une hyper salivation et sa voix devient rauque, plus la maladie progresse plus l'animal devient furieux.

Dans la forme paralytique ou muette, le signe prédominant est la paralysie, la mâchoire inférieure est pendante, la langue sort et une bave abondante s'écoule, l'animal ne peut pas mordre (Toma, 2004). La mort survient en général en moins de deux semaines.

## **1.6.Diagnostic**

En l'absence de symptômes pathognomoniques de la rage, le diagnostic clinique est très difficile. Le diagnostic de certitude doit obligatoirement s'appuyer sur l'examen de laboratoire, uniquement après la mort de l'animal, un prélèvement est effectué à partir du cortex, de l'hippocampe et du bulbe rachidien (Toma, 2008).

### **1.6.1. Identification de l'antigène rabique**

La mise en évidence d'antigènes rabiques dans les prélèvements cérébraux par immunofluorescence directe (IF) représente la technique de référence, elle est très rapide (moins de 2 heures), peu onéreuse et fiable (Bourhy et *al.*, 1989).

Elle consiste à mettre en contact des calques de corne d'Ammon avec un anticorps fluorescent dirigé contre la nucléocapside du virus. Sous microscope à fluorescence, les antigènes rabiques sont observés sous forme de particules vertes et brillantes irrégulières en taille et en forme correspondant à des amas intracellulaires de nucléocapside virales (Lumlertdacha, 2005).

La recherche des antigènes rabiques peut également être réalisée à partir de broyats cérébraux par immunocapture des nucléocapsides (technique ELISA) (Xu et *al.*, 2007). Les surnageants de ces broyats sont ainsi mis en présence de cupules sensibilisées avec des anticorps mono ou polyclonaux anti-nucléocapsides. Un mélange d'anticorps anti-

nucléocapsides couplés à une enzyme (la peroxydase) est utilisé pour la révélation après avoir ajouté le substrat adéquat. La réaction peut être lue au spectrophotomètre ou même à l'œil nu.

Un test rapide de détection des antigènes viraux par immunohistochimie directe a récemment été développé (Lembo *et al.*, 2006). Ce test repose sur l'analyse d'appositions ou de frottis cérébraux à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-nucléocapside couplés à la biotine.

### **1.6.2. Isolement du virus par inoculation à la souris**

Cette technique est basée sur l'inoculation intracérébrale d'une suspension de tissus cérébraux provenant de sujets suspects. La durée de l'observation de l'apparition des symptômes cliniques de la rage se fait sur une période de 10 à 28 jours. La présence de l'antigène rabique peut être recherchée par immunofluorescence sur un calque du cerveau des souris ayant présentés des signes de rage (Smith, 2003). Ce test est nécessaire pour la conservation et l'amplification des souches virales de terrain.

### **1.6.3. Isolement du virus par inoculation aux cultures cellulaires**

Cette technique est réalisée sur culture cellulaire (cellules de type neuroblastomes murins) à partir de broyats cérébraux, parfois de salive chez l'homme. Elle est rapide (moins de 24 heures) et très sensible (Bourhy, 1989). La présence d'inclusions virales dans le cytoplasme des cellules est révélée par immunofluorescence directe ou par ELISA (Bourhy, 1989). Ce test remplace avantageusement l'isolement viral sur l'animal.

### **1.6.4. Sérologie**

La recherche des anticorps antirabiques sur animal suspect n'est pas utilisée dans un but diagnostic. Ainsi, l'épreuve sérologique reste d'un intérêt limité dans le diagnostic de la rage, car les anticorps n'apparaissent qu'au stade ultime de l'évolution de la maladie, mais trouve son intérêt dans le contrôle des traitements post-exposition et des vaccinations pré-exposition (Smith, 1991).

Le titrage des anticorps spécifiques à la rage peut se faire à partir du sérum ou du LCR de sujets vaccinés ou "traités" contre la rage. La méthode de référence est la technique de séroneutralisation virale en culture cellulaire (technique de réduction des foyers fluorescents), une quantité définie de virus rabique est incubée avec des dilutions croissantes de sérum ou de LCR en présence de cellules, les foyers d'infection sont révélés sur le tapis cellulaire par immunofluorescence directe et dénombré sous microscope à fluorescence (Smith *et al.*, 1996).

L'épreuve sérologique rapide d'inhibition des foyers d'immunofluorescence (RFFIT, Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) permet d'apprécier le degré de l'immunité chez les sujets en cours de traitement antirabique ou vaccinés préventivement. Une quantité donnée de virus est mélangée à différentes dilutions de sérum à expertiser puis la limite de neutralisation est déterminée (Muller *et al.*, 2005).

La technique ELISA a été acceptée par l'OIE comme outil pour le screening (McElhinney *et al.*, 2008).

### **1.7.Traitement**

Chez l'homme uniquement, des traitements peuvent être appliqués avant l'apparition des symptômes ; par l'administration d'immuno-prophylaxie pré et post-exposition. Après l'apparition des premiers symptômes cliniques, les traitements administrés peuvent être soit de nature curative et tenter une guérison, soit de nature palliative et viser le confort et le soulagement du patient (Hendekli, 2005).

Depuis la vaccination de Joseph Meister en 1885 par Louis Pasteur, aucun progrès majeur n'a été fait en matière de thérapeutique post infection par le virus de la rage.

### **1.8.Prophylaxie**

#### **1.8.1. Prophylaxie sanitaire**

Les mesures de prophylaxie sanitaire en pays indemne de rage incluent le contrôle de la circulation des carnivores domestiques, la lutte contre les animaux errants ainsi que l'interdiction de toute importation d'animaux, ces mesures sont plus au moins drastiques selon les pays (Toma, 2008).

Dans les pays infectés, les chiens et en particulier les chiens errants sont responsables de 99 % des décès humains par la rage dans le monde (WHO, 2007). Il importe donc d'empêcher la transmission du virus rabique par le chien à la fois par des mesures défensives (comme le font les pays indemnes) mais aussi par des mesures offensives. Ceci implique la capture et la destruction des chiens errants ainsi que le contrôle strict de la circulation des carnivores domestiques (Toma, 2008).

**1.8.2. Prophylaxie médicale**

Elle consiste en la vaccination des populations animales (carnivores domestiques et dans certains pays les carnivores sauvages). Depuis quelques années, les animaux domestiques (surtout les bovins) sont pris en charge par la vaccination préventive au vue des pertes causées par la rage.

Chez l’homme, la vaccination peut être préventive (avant exposition) chez les personnes ayant un risque élevé d’exposition à la rage (les vétérinaires, les gardes forestiers, personnels de laboratoire) (Tableau 3), ou curative en association avec l’administration d’immunoglobulines antirabiques humaines ou équine en cas d’exposition à un risque rabique (Toma, 2008) (Tableau 4).

**TABLEAU 3 : Conduite de la vaccination avant exposition (Aubry et Rotivel, 2001)**

<b>Exposition</b>	<b>Risque</b>	<b>Population</b>	<b>Prophylaxie</b>
<b>Continue</b>	Risque permanent par contact avec des matières virulentes	Professionnels des laboratoires de recherche, de diagnostic, de production dans le domaine de la rage	- Vaccination avant exposition - Contrôle sérologique indispensable, régulier
<b>Discontinue</b>	Risque fréquent par contact avec des animaux sensibles en région enzootique par profession, voyage ou loisir	-Vétérinaires, éleveurs, forestiers, gardes chasses. - Personnels des refuges, d’animaleries, d’abattoirs, de capture. -Voyageurs, expatriés Taxidermistes, chasseurs, spéléologues	- vaccination avant exposition - contrôle sérologique facultatif
<b>Occasionnelle</b>	Risque égal ou inférieur à celui d’une population générale en région enzootique	Autres situations	- Pas de vaccination avant exposition - Vaccination après exposition - Immunoglobulines associées ou non - Contrôle sérologique en cas particulier

**TABLEAU 4: Prophylaxie post-exposition recommandée en cas de risque d'infection par le virus rabique (OMS, 2010)**

<b>Type de contact avec un animal suspect</b>	<b>Mesures post-exposition</b>
<b>Type I:</b> la personne a touché ou nourri des animaux ou a été léchée alors que sa peau était intacte (pas d'exposition)	Aucune
<b>Type II:</b> la personne a été léchée alors que sa peau était égratignée ou a subi de petites égratignures sans saignement	Vaccination immédiate et traitement de la plaie
<b>Type III :</b> la personne a subi une ou plusieurs morsures transdermiques ou a été léchée alors qu'il y avait une effraction cutanée; la personne a été contaminée par contact des muqueuses avec de la salive à la suite d'un léchage ou a été exposée à des chauves-souris	Vaccination immédiate et administration d'immunoglobuline antirabique; traitement de la plaie

## **2. LES VACCINS ANTIRABIQUES**

### **2.1. Définition de la vaccination**

La vaccination consiste à immuniser une personne ou un animal contre une maladie infectieuse, généralement en lui administrant un vaccin. Les vaccins, qui stimulent le système immunitaire, prémunissent la personne d'une infection ou d'une maladie (OMS, 2013).

La vaccination contre la rage consiste en l'administration à l'organisme, d'un antigène rabique capable de lui conférer une résistance ultérieure envers cette maladie (Andral et Blancou, 1982).

### **2.2. Définition d'un vaccin**

Un vaccin est une préparation antigénique, dérivée d'un agent infectieux pathogène, modifiée pour être rendue inoffensive et conservant ses propriétés immunisantes. Son inoculation à un sujet réceptif induit une réponse immunitaire protectrice, spécifique d'un agent infectieux donné, capable de le protéger contre l'infection naturelle ou d'en atténuer les conséquences (Piednoir, 2012).

### **2.3. Composition du vaccin antirabique**

#### **2.3.1. La souche vaccinale**

Certaines souches de virus rabique subissent dès leur isolement, de nombreux passages soit sur animal (lapin, souris), soit sur cellules afin d'obtenir un comportement biologique reproductible et caractéristique de la souche (Lecocq, 1985). Ces souches sont appelées "souches fixes" puisque certains de leurs caractères ont été fixés, comme la durée d'incubation, un titre élevé et constant, et elles sont non infectieuses par voie périphérique (Tordo, 1988). Elles sont utilisées pour la fabrication de vaccins (Dietzschold et *al.*, 1987) (cf annexe 1). Encore appelées "souches de laboratoire", les souches fixes dérivent principalement et historiquement de trois isolats de virus rabiques (Clark & Wiktor, 1972) :

- la souche Pasteur, isolée d'une vache en 1882, à l'origine des souches CVS (Challenge Virus Standard), PV (Pasteur Virus) et PM (Pitman-Moore),
- une souche isolée d'un chien aux Etats-Unis (Alabama) en 1935, à l'origine des souches SAD (Street Alabama Dufferin) et ERA (Evelyn-Rokitnicki-Abelseth),

- une souche provenant d'une jeune fille nommée Flury, décédée de la rage en 1939 aux Etats-Unis, à l'origine des souches Flury LEP (Low Egg Passage, obtenue après 136 passages sur des poussins d'un jour) et Flury HEP (High Egg Passage, obtenue après 2505 passages sur des poussins d'un jour).

### **2.3.2. L'antigène vaccinal**

L'antigène vaccinal correspond au virus vivant atténué ou inactivé qui induit la réponse immunitaire.

Les antigènes vaccinaux baignent dans des milieux spécifiques contenant des minéraux, des sucres, des acides aminés, des vitamines et des facteurs de croissance (Pilette, 2009). Ils doivent être stériles et leur composition varie selon le procédé de fabrication du vaccin (sérum physiologique, solution tampon).

Ces antigènes peuvent se présenter sous forme liquide (vaccins prêts à l'emploi) ou sous forme lyophilisée (vaccins à reconstituer avec un solvant) (Grezel, 2006).

### **2.3.3. L'adjuvant**

L'incorporation d'un adjuvant à un vaccin a pour but d'améliorer, accélérer et prolonger la réponse immunitaire spécifique dirigée contre un antigène. Elle permet également de diminuer la dose d'antigène nécessaire pour induire une immunité (Bégué et *al.*, 2012). Sont utilisés comme adjuvants : des sels d'aluminium, des adjuvants huileux (émulsions). Les sels d'aluminium peuvent induire secondairement une réaction allergique chez certaines personnes (Richard, 1990).

### **2.3.4. Résidus du processus de fabrication**

Les virus doivent être cultivés sur des substrats afin d'en obtenir de grandes quantités pour une production industrielle de masse. Les cellules sur lesquelles sont cultivés ces micro-organismes sont généralement des cellules animales. Des résidus de milieu de culture peuvent subsister dans le produit fini ce qui provoque des réactions allergiques (Georget, 2009).

### **2.3.5. Les conservateurs et les stabilisants**

Les conservateurs inhibent la croissance des contaminants bactériens et fongiques susceptibles de détériorer le vaccin avant son utilisation (antibiotiques). Les conservateurs sont utilisés pour stabiliser l'antigène ce qui permet de préserver l'activité virale.

Les stabilisants ont un rôle protecteur de l'antigène viral contre les pertes de titres durant le stockage, ils sont utilisés pour maintenir l'intégrité de la particule ce qui assure son immunogénicité (Grainger, 2007).

### **2.4. Différents types de vaccins antirabiques**

Les vaccins antirabiques peuvent être classés soit selon leur caractère vivant ou inactivé, soit selon leur mode de production

#### **2.4.1. Selon leur caractère vivant ou inactivé**

##### **2.4.1.1. Vaccins à virus vivants**

Ces vaccins possèdent une virulence résiduelle qui peut s'avérer dangereuse, mais en contrepartie possèdent un bon pouvoir immunogène malgré un titre viral beaucoup plus faible que celui des vaccins à virus inactivés. Ils sont par contre plus fragiles à la chaleur (Thevenot, 2003). Le virus est capable de se multiplier une fois injecté dans l'organisme, mais n'atteint jamais le cerveau (ces types de vaccins ne sont utilisés que pour les animaux domestiques et sauvages). Exemple : Vaccins Flury, ERA, SAD.

##### **2.4.1.2. Vaccins à virus inactivés**

L'agent infectieux est entier, il est inactivé par différents procédés physiques et/ou chimiques (les rayons UV, le formaldéhyde, la bêta propriolactone). Ces vaccins sont dépourvus de virulence résiduelle, ils sont plus stables, mais ont un pouvoir immunogène plus limité s'ils ne contiennent pas d'adjuvant (Toma, 2006).

#### **2.4.2. Selon leur mode de production**

##### **2.4.2.1. Vaccins produits sur encéphale d'animaux adultes**

Il s'agit de vaccins de type Semple ou Fermi préparés sur encéphale de mouton ou d'agneau (inde), actuellement inactivé par la bêta propriolactone (BPL) (Rotivel *et al*, 2001).

Ils ne sont plus utilisés dans la plupart des pays, car ils contiennent des facteurs encéphalitogènes et risquent d'avoir un pouvoir immunogène limité (Thevenot, 2003).

##### **2.4.2.2. Vaccins produits sur encéphale d'animaux nouveau-nés**

Ce sont des vaccins préparés sur cerveaux de souriceaux nouveau-nés (SMBV: Suckling Mouse Brain Vaccine ou vaccin Fuenzalida), utilisé dans la plupart des pays en voie de développement (Viêtnam, Cambodge, Brésil, Algérie, Madagascar) (Cora, 2009). Ces

vaccins renferment peu (ou pas) de facteurs encéphalitogènes et ont un bon pouvoir immunogène. La souche *Flury* ainsi que la souche *SAD* (ou ses dérivés) sont les plus utilisées dans la production de ce type de vaccin.

L'utilisation des vaccins préparés sur tissus nerveux est fortement déconseillé par l'OMS qui recommande de mettre fin dès que possible à leur production et à leur utilisation et de les remplacer par des vaccins préparés en culture cellulaire (WHO, 2005).

### **2.4.2.3. Vaccins produits sur embryon de canard**

Préparés à partir d'embryons de canard (Purified Duck Embyo Vaccine PDEV), ces vaccins ne sont pratiquement plus produits malgré que leur efficacité et innocuité soient identiques à celles des vaccins cellulaires (Rotivel, 2001).

Ce type de vaccin a été produit par l'Institut Pasteur d'Algérie pour usage vétérinaire (vaccin avianisé produit sur embryons de poulet).

### **2.4.2.4. Vaccins produits sur culture cellulaire**

Ils sont constitués de virus rabiques qui sont multipliés sur des substrats cellulaires

- Vaccins préparés sur culture de cellules diploïdes humaines (HDCV) (Johnson et *al.*, 2010b).
- Vaccins purifiés préparés sur cultures de cellules d'embryon de poulet (PCECV) (Sampath et *al.*, 2010).
- Vaccins purifiés préparés sur culture de cellules Vero (PVRV) (Chen & Chen, 2009).

La dernière génération de vaccins préparés sur des cellules d'embryons de poulet ou des cellules Vero a donné des résultats comparables, en terme d'innocuité et d'efficacité, à ceux des vaccins préparés sur des cellules diploïdes humaines, ils sont en revanche moins onéreux (Plotkin et *al.*, 2008). Ces vaccins ne renferment pas de facteur encéphalitogène (faible titre en protéines étrangères) et possèdent un bon pouvoir immunogène.

Les souches *SAD* et *ERA* ont été employées pour la production de ce genre de vaccin, en Algérie, la souche *ERA* a été multipliée sur cellules Vero en flacons roulants et sur microbilles. Un vaccin expérimental purifié sous gradient de saccharose par la technique d'ultracentrifugation zonale à flux continue a été mis au point (Brahimi & Benmansour, 1986, 1988).

Pour des raisons de coût de production élevé, ces vaccins sont produits et utilisés principalement dans les pays développés et dans d'autres pays émergents ayant maîtrisé cette technologie.

#### **2.4.2.5. Vaccins produits par génie génétique**

##### **A. Vaccins recombinants (VRG)**

La glycoprotéine du virus a été exprimée sous forme recombinante dans un virus de type vaccine. Le vaccin résultant est actuellement utilisé pour la vaccination par voie orale des renards (Aubry & Rotivel, 2001).

Les vaccins recombinants sont dépourvus de virulence rabique résiduelle, mais leur innocuité doit également être évaluée en ce qui concerne le microorganisme porteur.

##### **B. Vaccins à ADN**

Ils ne contiennent ni virus, ni glycoprotéine, mais un fragment d'ADN codant pour cet antigène. Ces vaccins permettraient de protéger contre d'autres virus. Ils ont été testés chez les animaux avec succès, ce qui ouvre des perspectives nouvelles pour l'usage chez l'homme (Aubry & Rotivel, 2001).

##### **C. Vaccins sous-unitaires**

Les sous unités virales peuvent être séparées après dissociation du virion pour que le vaccin ne contienne plus que les constituants nécessaires à l'élaboration d'anticorps protecteurs, on peut citer comme exemple le vaccin antirabique constitué par la glycoprotéine G (Melnick, 1989). Ces vaccins offrent de nouvelles opportunités pour le traitement et la prévention des maladies infectieuses.

Les protéines inductrices de la réponse immunitaire sont obtenues par purification ou concentration des protéines immunogènes à partir de l'agent pathogène, ou par génie génétique, pour être ensuite insérés à l'hôte récepteur. Ces vaccins sont appelés vaccins peptidiques synthétiques. L'adjuvant est indispensable dans ce cas pour optimiser l'action du vaccin (Leprêtre, 2008).

### 3. LES IMMUNOGLOBULINES RABIQUES

La technique utilisée pour la production d'immunoglobulines rabiques emploie généralement comme support de production le cheval ou le mulet que l'on immunise avec une souche de virus fixe ; c'est le cas de la souche Louis Pasteur Saigon utilisée en Algérie. On pratique d'abord une immunisation prolongée pendant deux mois avec un vaccin inactivé, cette vaccination est ensuite suivie d'inoculation de doses croissantes de virus vivant.

Les animaux utilisés doivent être soigneusement sélectionnés lors de l'immunisation primaire. Un titrage des anticorps fait en cours d'immunisation permet d'éliminer les animaux présentant une immunisation insuffisante et de ne retenir que ceux qui sont capables de donner un sérum de titre élevé (Lépine & Atanasiu, 1967). Le test de contrôle des titres utilisé est la technique de réduction des foyers fluorescents (RFFIT).

De l'immunoglobuline rabique doit être administrée à toutes les personnes ayant subi une exposition de catégorie III ou ayant subi une exposition de catégorie II et immunodéficients (tableau 03). L'immunoglobuline antirabique humaine a une clairance relativement faible (demi-vie d'environ 21 jours), de sorte qu'elle constitue le meilleur produit, notamment en cas d'expositions sévères multiples et de morsures à la tête, à la face et aux mains. Toutefois, l'immunoglobuline antirabique humaine est difficile à se procurer et n'est disponible pratiquement que dans les pays industrialisés.

Lorsque ce produit est indisponible ou que son prix est très élevé, il convient d'utiliser de l'immunoglobuline équine ou ses fragments  $F(ab')_2$  même si les fragments  $F(ab')_2$  ont une clairance plus rapide que l'immunoglobuline antirabique humaine. La plupart des nouvelles préparations d'immunoglobuline équine hautement purifiées sont actives, sûres et considérablement moins coûteuses que l'immunoglobuline antirabique humaine. Elles sont néanmoins d'origine hétérologue et comportent un faible risque de réaction anaphylactique (1/45 000 cases) (Whied et *al.*, 1989, Suwansrinon et *al.*, 2007).

A l'institut Pasteur d'Algérie (IPA), le sérum antirabique est produit sur chevaux et mulets sélectionnés.

### **4. CONTROLE DES VACCINS ANTIRABIQVES**

Le contrôle de la qualité des vaccins antirabiques est d'une importance primordiale pour tout programme de lutte contre la rage. Il permet d'éliminer les lots de vaccins qui ne répondent pas aux normes requises. Ainsi, un lot de vaccins à virus inactivés ne doit être agréé que s'il satisfait aux critères suivants : stérilité microbiologique, inactivation du virus rabique et absence de toxicité anormale (Thraenhart, 1989).

Les temps de contrôle représentent souvent plus des trois quarts du temps du cycle de fabrication.

#### **4.1. Contrôle de la stérilité**

Une garantie suffisante de la stérilité et de l'absence de contamination ne peut être obtenue que par un contrôle adapté des matières premières utilisées et de leur condition de stockage et de transformation. Des tests sur le produit fini sont nécessaires pour vérifier que le contrôle a été réalisé de façon adéquate. Le vaccin doit être stérile et exempt de tout agent contaminant.

#### **4.2. Contrôle du titre initial**

La technique adéquate de titrage est celle qui permet de connaître le nombre ou le rendement en particules virales par millilitre de produit recueilli. Ce titrage est réalisé après récolte de l'agent viral. Ce test est assuré *in-vivo* par l'épreuve d'inoculation à la souris ou *in-vitro* sur cellules. Les préparations ayant un titre de  $10^{-6}$ DL<sub>50</sub>/ml à  $10^{-8}$ DL<sub>50</sub>/ml produiront un vaccin avec une activité antigénique satisfaisante (Kaplan & Koprowski, 1974, Meslin et al., 1999).

#### **4.3. Contrôle de la stabilité**

Historiquement, le test de stabilité des vaccins a été basé sur l'observation de la sensibilité à différentes températures (Jadhav et al., 2009). En 1980, le test de thermostabilité a été introduit comme un des contrôles pour la libération des lots de vaccin du groupe antirabiques (WHO, 1992).

La durée de validité des vaccins qui sera proposée doit être vérifiée par des tests appropriés. Ces expérimentations comprennent des tests de stabilité biologique et physico-chimiques et doivent être effectués sur un nombre suffisant de lots de vaccins conservés dans

les conditions recommandées. Pendant ces périodes de contrôle, le titre viral du vaccin ne doit pas diminuer de manière à rendre le vaccin inactif.

La thermostabilité des vaccins à virus vivants présentés sous forme liquide est en général faible. Les vaccins à virus inactivés lyophilisés ont une stabilité d'une durée de 2 ans à une température de 4°C (Manuel terrestre de l'OIE, 2005).

### **4.4. Contrôle de l'innocuité**

L'innocuité d'un vaccin antirabique est l'absence de réactions post-vaccinales indésirables chez le sujet vacciné. La teneur en protéines non spécifiques est un des critères de la qualité d'un vaccin. Les vaccins inactivés purifiés, produits sur culture cellulaire, sont ceux qui contiennent le moins de protéines non spécifiques. Ils sont presque exclusivement composés de particules de virus rabique. Cela est difficile à réaliser pour les vaccins produits sur tissu cérébral. De plus, les vaccins à base d'encéphale d'animaux adultes contiennent des éléments neuroparalytiques tels que la myéline, mais ce mode de fabrication est délaissé.

Pour les vaccins à virus vivants, un test d'innocuité doit être effectué sur chaque lot de vaccin sur espèce cible. Au moins 3, mais de préférence 5 à 6 animaux de l'espèce cible reçoivent une dose équivalente à 10 fois la dose recommandée pour l'utilisation du produit par la voie d'administration classique du produit. Les animaux sont observés pendant 90 jours pour mettre en évidence toute réaction secondaire (Manuel terrestre de l'OIE, 2005).

Les tests de virulence résiduelle des lots de vaccin à virus inactivés sont effectués par inoculation de cellules en culture ou de souris par voie intracérébrale pour mettre en évidence des virus viables.

La solution au problème de l'innocuité des vaccins antirabiques consiste à développer des vaccins préparés à partir de virus rabiques obtenus sur des cultures exemptes de tissu nerveux (Plotkin & Koprowski, 1994). Depuis 1976, l'utilisation de vaccins produits en culture de cellules diploïdes humaines (HDCV) s'est généralisée pour la vaccination des personnes avant et après exposition. Le HDCV suscite une bien meilleure réponse immunitaire que d'autres comme le PDEV (préparé à partir d'embryons de canard) ou ceux préparés à partir de cerveaux de souriceaux à la mamelle (vaccin Fuenzalida) ou de cervelles de moutons adultes ou de lapins (vaccin Semple).

### **4.5. Contrôle de l'activité**

La glycoprotéine G est le seul antigène de la particule du virus rabique important dans la stimulation d'anticorps neutralisant le virus (Cox et *al.*, 1977), la forme native repliée de la glycoprotéine G associée au virion (trimère) est très immunogène alors que la forme non associée (libre), monomère est faiblement immunogène (Dietzscold et *al.*, 1983).

Les méthodes de quantification de cette protéine sont d'une grande importance pour le contrôle et la standardisation des vaccins antirabiques inactivés pour une utilisation chez l'homme et les animaux. Actuellement, des essais *in-vivo* sont couramment utilisés pour normaliser ces vaccins. Parmi ces tests, les plus utilisées sont le test de Habel (Habel, 1973) et le test des National Institutes of Health (NIH) (Sligman, 1973).

La quantité de virus présente dans les vaccins vivants atténués est déterminée par titrage. Une fois que la corrélation a été établie entre l'activité du vaccin sur l'espèce cible et le titre viral, le titrage de virus devient un indicateur fiable de l'efficacité du vaccin. Il est alors effectué sur cultures cellulaires ou par inoculation intracérébrale à des souris (WHO, 1996).

Pour les vaccins à virus inactivés, la corrélation entre l'activité pour l'espèce cible et la valeur antigénique obtenue sur la souris constitue un indicateur fiable de l'activité du vaccin. L'efficacité du vaccin est établie aux USA par le test des NIH, ce test est utilisé couramment au niveau du service Rage de l'IPA pour le contrôle de l'activité du vaccin antirabique tissulaire. Ailleurs, le test de la Pharmacopée Européenne est largement adopté (WHO, 1996).

#### **4.5.1. Test de Habel**

Ce test consiste à éprouver des souris, vaccinées ou non, avec des doses croissantes du virus d'épreuve. L'activité du vaccin contrôlé est exprimée par l'indice de Habel qui est obtenu en effectuant la différence entre les logarithmes des doses entraînant la mortalité à 50% des animaux vaccinés de celui des animaux témoins (Habel, 1940). (cf annexe 2)

Ce test est en voie d'abandon du fait de son imprécision pour les vaccins de valeur «moyenne» et des difficultés de sa standardisation au niveau européen (Blanco, 1985).

#### **4.5.2. Test des National Institutes of Health (NIH)**

Actuellement, le test des National Institutes of Health (NIH) est le plus utilisé, il a pratiquement remplacé le test de Habel. Ce test a été décrit par Sligman (1955).

Un premier lot de souris reçoit à deux reprises, à 7 jours d'intervalle, le vaccin à contrôler avec différentes dilutions, un autre lot de souris reçoit de la même manière du vaccin de référence. Sept jours après la 2<sup>ème</sup> injection, les souris sont soumises à une épreuve virulente avec une dose variant entre 5 et 50 DL<sub>50</sub> de la souche virale d'épreuve CVS par injection intracérébrale.

Pour calculer l'activité du vaccin, on utilise la méthode gravimétrique qui nécessite la détermination de la DE<sub>50</sub> (dose efficace 50%) et qui correspond au poids en mg de la suspension de tissu nerveux d'un vaccin antirabique, protégeant 50% des souris éprouvées par une dose donnée de virus rabique (5 à 50DL<sub>50</sub>). La méthode gravimétrique utilise le rapport de la DE<sub>50</sub> d'un vaccin de référence à la DE<sub>50</sub> du vaccin à expertiser, ce rapport appelé valeur antigénique (VA) doit être d'au moins 0,3 pour que le vaccin à expertiser satisfasse à l'épreuve.

Ce test a l'avantage d'être plus précis, relativement reproductible et permet d'exprimer la valeur antigénique des vaccins en unités internationales.

### **4.5.3. Test de la pharmacopée européenne**

Utilisé par tous les pays du Conseil de l'Europe. Il est basé exactement sur les mêmes principes que le test des NIH, mais le lot de souris ne reçoit qu'une injection des différentes dilutions de vaccin (au lieu de 2 injections à 7 jours d'intervalle). Ce test discrimine mieux les vaccins de faible valeur antigénique par rapport au test des NIH. Il utilise le même vaccin de référence que le test des NIH et la valeur de ses U.I. est équivalente à celle des NIH. Pour ces deux tests (test des NIH et pharmacopée européenne), la valeur antigénique minimale requise par l'OMS est de 0,3 UI/dose.

Par ailleurs, un test simplifié n'employant qu'une dilution de vaccin permet d'obtenir un résultat qualitatif, c'est-à-dire de déterminer si un vaccin doit subir ou non, un test complet, par une technique de screening plus simple et moins coûteuse (Aubert & Blanco, 1982).

Ces tests demandent beaucoup de temps et présentent l'inconvénient d'employer des virus infectieux, ce qui nécessite l'utilisation d'installations de confinement spécifiques. En outre, les estimations du potentiel qui en découlent montrent une variabilité considérable (Wiktor et al., 1978). Il est généralement admis que des tests plus satisfaisants et rapides sont nécessaires pour le contrôle in process et la standardisation des vaccins antirabiques (Barth & Jaeger, 1979).

Des méthodes alternatives ont été ainsi développées, sur la base du principe des 3R qui a été lancé en 1960 par deux biologistes anglais Russel & Burch, pour raffiner, réduire et remplacer l'utilisation d'animaux pour les tests d'activité et d'innocuité des vaccins. Les alternatives de remplacement désignent les méthodes permettant d'éviter ou de remplacer l'utilisation d'animaux, les alternatives de réduction se réfèrent à toute stratégie débouchant sur l'utilisation moindre d'animaux et les alternatives de raffinement désignent les modifications apportées à l'élevage ou aux procédures expérimentales en vue de minimiser la douleur et la détresse et d'améliorer le bien-être des animaux utilisés à des fins scientifiques, de la naissance à la mort (Richmond, 1999).

#### **4.5.4. Test d'hémagglutination**

Les premiers travaux sur l'hémagglutination par le virus de la rage ont été publiés par Halonen et *al.* en 1968. Ces auteurs ont signalé que la souche CVS agglutinait les érythrocytes d'oie, de poussin de deux jours, de poulet adulte, de cobaye, de rat, de mouton et d'homme (du groupe sanguin O) à condition que le virus soit cultivé en l'absence des inhibiteurs de l'hémagglutination qui sont présents dans tout sérum normal. C'est à basse température, à pH 6,2 et en utilisant des érythrocytes d'oie, qu'on met le mieux en évidence l'hémagglutination par le virus rabique.

A l'Institut Pasteur de Kouba, un test a été fait avec la souche ERA qui a agglutiné les globules rouges d'oie adulte à +4°C. Le phénomène n'a pas été observé à la température ambiante ni à 36°C (Benmansour & Brahimi, 1988 ; Brahimi, 1992). En outre, une hémagglutination pleinement positive entre 0 et 4°C se négative rapidement à la température du laboratoire.

Kuwert et *al.* (1968) ont pu confirmer et élargir ces observations, ainsi toutes les souches de virus rabique quel que soit le type de cellules utilisées comme support, agglutinent les érythrocytes d'oie dans les conditions optimales. Cependant, le virus rabique cultivé en système nerveux central d'animaux de laboratoire ne produit pas ce phénomène même s'il est partiellement purifié, il est en effet impossible d'en séparer les inhibiteurs de l'hémagglutination. Part contre, le virus rabique obtenu en culture de tissus, additionné de séralbumine bovine peut être adsorbé quantitativement sur des érythrocytes d'oie et en être élué par élévation de la température et/ou du pH. Les globules rouges, une fois traités par l'hémagglutinine du virus rabique, continuent à être hémagglutinés par la même souche ou par une autre souche de virus rabique.

L'hémagglutination passive permet un titrage précis de l'antigène vaccinal (Andral & Blancou, 1982).

### **4.5.5. Test immuno-enzymatique ELISA**

Le dosage immuno-enzymatique (ELISA) est un test *in-vitro* qui peut être utilisé pour analyser l'activité des vaccins antirabiques (WHO, 1984 et 1986).

Le principe de ce test est basé sur la mesure de la teneur de la glycoprotéine du virus de la rage dans le vaccin, méthode indirecte (Atanasiu et *al.*, 1980) ou méthode d'immuno-capture (Lafon et *al.*, 1985, Perrin et *al.*, 1990). Dans la méthode d'immuno-capture, le vaccin à tester est mis en incubation dans des plaques de micro-titration préalablement sensibilisées avec des anticorps anti-glycoprotéine (anticorps polyclonaux ou monoclonaux) neutralisant le virus (Libeau et *al.*, 1986). Les antigènes liés sont ensuite identifiés en ajoutant le même anticorps marqué à la peroxydase, qui en présence de substrat est dégradé pour donner un produit chromogène. Le contenu de la glycoprotéine du vaccin est alors déterminé par comparaison de sa capacité d'absorption avec celle d'un vaccin de référence.

## 5. L'IMMUNODIFFUSION SUR GELOSE

Durant ces dernières années, des tests *in-vitro* pour le contrôle in process de produits biologiques tels que les vaccins contre la rage et les sérums ont été élaborés et appliqués dans le monde entier dans le but de fournir aux fabricants de vaccins des procédés qui permettraient de recueillir des données préliminaires sur la future qualité du produit fini (Hendriksen, 1997). L'un de ces procédés est le test d'immunodiffusion (Arko et *al.*, 1973 & Barth et *al.*, 1981).

### 5.1.Principe

Ce test se base sur une particularité de l'interaction antigène-anticorps, à savoir la formation par ces deux partenaires d'un réseau de précipitation. La formation du complexe antigène-anticorps est due à l'interaction entre les épitopes de l'antigène et les paratopes de l'anticorps, elle fait intervenir 4 types de liaisons non covalentes (relativement faibles) de type hydrogènes, électrostatiques, hydrophobes et les forces de Van der Waals.

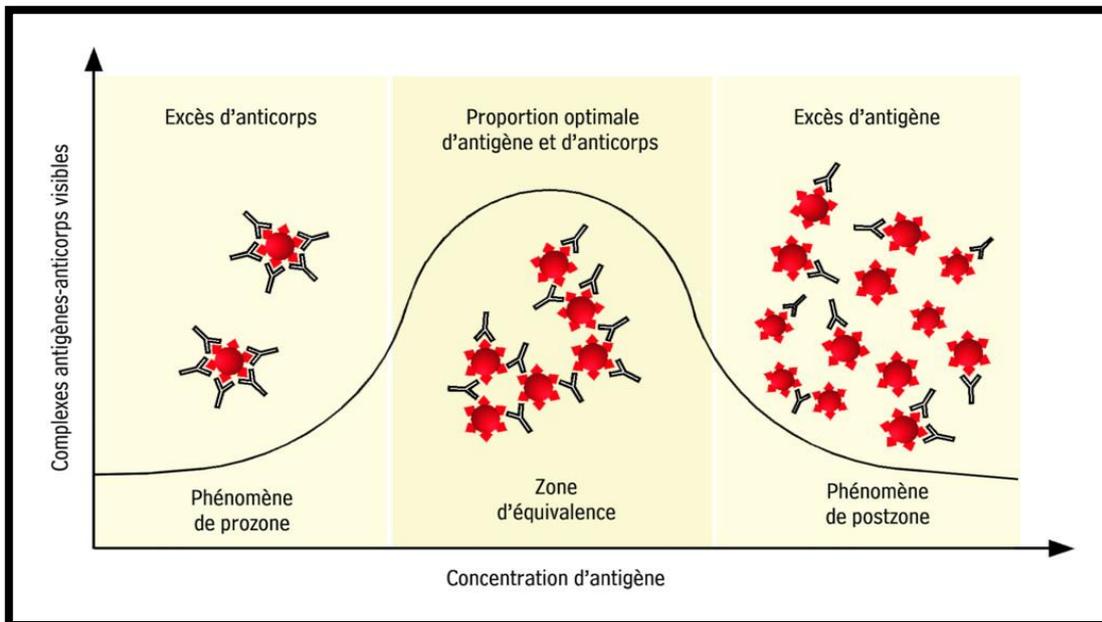
Lorsqu'on ajoute différentes quantités d'antigène à une quantité fixe d'anticorps ou l'inverse, des complexes antigènes-anticorps stables se forment suite à la liaison des deux réactifs. Ces complexes, s'ils ne sont pas trop gros, continueront à diffuser, ils continueront aussi de grossir en entrant en contact avec d'autres antigènes ou d'autres anticorps.

Au point d'équivalence, des complexes massifs (contenant des milliers d'antigènes et d'anticorps reliés ensemble) se formeront et seront emprisonnés dans le gel à cause de leur taille et ne pourront plus diffuser (Crowle, 1973). Le point d'équivalence ou zone d'équivalence est le rapport optimal du nombre d'antigènes et d'anticorps polyclonaux où se forment de très longues chaînes d'antigènes liés à des anticorps.

Lorsqu'il y a beaucoup trop d'antigènes par rapport aux anticorps, il se formera des complexes antigène-anticorps (A) avec un résidu d'excès d'antigènes non liés. Inversement s'il y a beaucoup trop d'anticorps par rapport aux antigènes, il se formera des complexes antigènes-anticorps (B) où un antigène sera attaché à quelques anticorps avec un excédent d'anticorps libres. Les complexes antigènes-anticorps (A et B) sont relativement petits et peuvent diffuser dans les pores d'un gel d'agarose, tout comme les anticorps et les antigènes libres. Au fur et à mesure que les anticorps et les antigènes migrent l'un vers l'autre, le rapport antigène-anticorps devient optimal, des complexes de plus en plus gros se forment jusqu'à

contenir des milliers de molécules associées en de gigantesques complexes insolubles et immobilisés dans le gel. Ces complexes s'appellent "précipitine" (Crowle, 1973).

On définit ainsi 3 zones : une zone d'excès d'anticorps, une zone d'excès d'antigènes et une zone d'équivalence représentées dans la courbe de précipitation (Figure 6).



**FIGURE 6 :** Représentation de la courbe de précipitation ([www.toutsurlatransfusion.com](http://www.toutsurlatransfusion.com))

La zone d'équivalence pour laquelle on a un maximum de réseau dépend de nombreux paramètres qui influencent en fait l'affinité des deux partenaires entre eux (Balter et *al.*, 2006) :

- Le pH : la baisse du pH entraîne une baisse de l'affinité ;
- La force ionique : l'affinité de la liaison diminue avec l'augmentation de la force ionique ;
- La température : en général l'affinité augmente avec la température (37° C). Quand celle-ci augmente, il se produit une augmentation et une accélération des mouvements browniens et donc une mise en place plus rapide des produits de la réaction.

### 5.2. Impératifs de la réaction de précipitation

- L'antigène doit être au moins bivalent (2 épitopes) : un haptène ne donne pas de réaction (un seul épitope).
- L'anticorps doit être au moins bivalent (2 paratopes) : Fab ne donne pas de précipité ; seuls les sérums polyclonaux donnent des réactions de précipitation.

L'utilisation de cette propriété de précipitation peut se faire en milieu liquide ou solide (gélifié) dans un but qualitatif ou quantitatif.

### **5.3. Propriétés des gels**

Les techniques d'immunodiffusion se font sur des gels d'agarose. L'agarose est une forme purifiée de l'agar, une substance extraite de certaines algues et utilisée en microbiologie.

L'agarose est un polymère linéaire et non chargé où s'alternent des résidus de galactose et d'anhydrogalactose. La purification permet d'éliminer une bonne partie des composantes ioniques de l'agar qui perturberaient la diffusion ou la migration électrophorétique en créant de l'endo-osmose. La gélification de l'agarose se fait par formation de ponts hydrogènes entre les chaînes de polymère. Les liens hydrogènes étant déstabilisés par l'agitation thermique, la gélification se fait à température beaucoup plus basse que la dissolution de l'agarose (Merklen et *al.*, 1973).

L'agar est en solution visqueuse à une température nettement inférieure à celle qui est susceptible de dénaturer les réactifs immunitaires. On utilise habituellement des solutions à une température de 48 ou 50°C ; le gel se forme après refroidissement à 38°C. Après solidification, on creuse dans le gel des puits qui pourront contenir les échantillons. Ces derniers pourront par la suite diffuser dans les mailles du gel d'agarose. Tous les montages sont maintenus en position parfaitement horizontale pour favoriser une diffusion circulairement homogène autour du puits.

Comme tous les gels, l'agarose solidifiée a une porosité correspondant à sa concentration. Pour des concentrations comprises entre 0,5 et 2%, sa trame est suffisamment poreuse pour que les complexes protéiques et les acides nucléiques puissent diffuser. La grande taille des mailles des gels d'agarose, comparée aux gels de dextran ou d'acrylamide, permet la diffusion des complexes Ag-Ac. Aux concentrations allant de 1 à 2%, l'agarose prend une consistance suffisamment rigide pour permettre une manipulation aisée.

La concentration habituellement employée dans les techniques immunochimiques est de l'ordre de 1% (Merklen et *al.*, 1973).

L'agar est transparent, ce qui permet d'observer les précipités même sans coloration. Il est préférable de les colorer pour une lecture plus aisée et c'est aussi une forme de conservation des gels sur une longue période.

#### **5.4. Coloration des gels**

Avant de procéder à la coloration, il convient d'éliminer les anticorps, les antigènes et les autres protéines n'ayant pas formé lavage de complexes antigène-anticorps. Pour cela on laisse tremper le gel dans un grand volume d'un tampon de qui permet le déplacement des molécules diffusibles hors du gel. Cette procédure est généralement suivie d'un séchage du gel d'agarose, ce qui accélérera les procédures subséquentes de coloration et de décoloration.

Viennent ensuite les procédures de coloration proprement dite. Le colorant le plus utilisé est le bleu de Coomassie qui, en présence d'éthanol en milieu acide, a une forte affinité pour les protéines. La présence d'acide a aussi l'avantage de "fixer" les protéines, c'est-à-dire de les précipiter et de les insolubiliser sur place. Après avoir laissé le temps au colorant de s'adsorber sur les protéines, on en élimine l'excédent avec un décolorant. Ce dernier favorise la diffusion hors du gel du colorant non adsorbé sans toutefois entraîner le détachement de celui qui est lié sur les protéines.

À la fin du processus, on peut observer des arcs colorés dans un gel transparent (Crowle, 1973).

#### **5.5. Intérêts des réactions de précipitation en milieu gélifié**

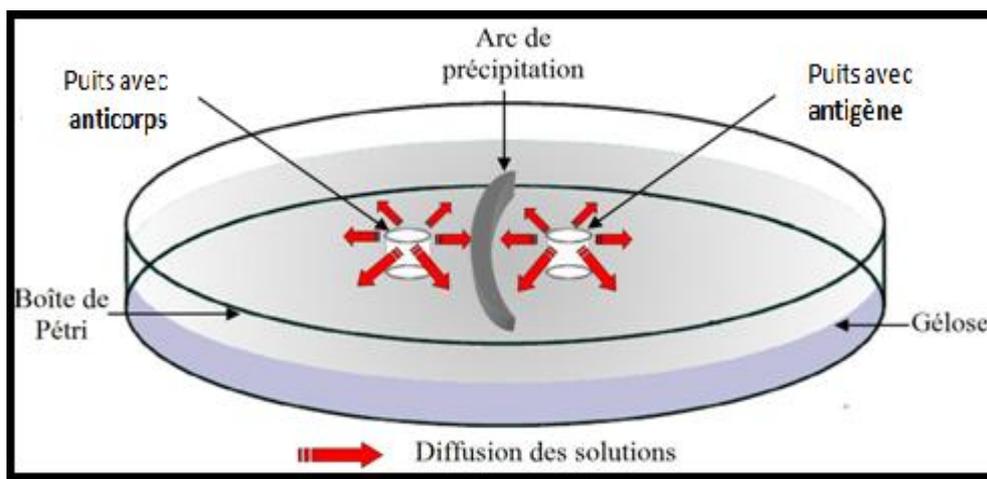
La diffusion de l'un ou des deux réactifs (antigènes ou anticorps) s'effectue régulièrement fournissant des zones de concentrations identiques et régulièrement progressives. On peut alors réaliser des rapports de concentration précis, favorables à la précipitation.

Si les préparations d'antigènes et d'anticorps comportent respectivement plusieurs systèmes antigène-anticorps, des zones de précipitation distinctes apparaissent pour chaque système permettant l'analyse de la complexité des préparations. En effet, chaque trait ou zone de précipitation correspond à un rapport optimal de proportion antigène/anticorps qui est celui de la zone d'équivalence. Le lieu où s'établit ce rapport optimal est habituellement différent pour chacun des systèmes lorsqu'il en existe plusieurs dans le milieu de réaction. Deux traits ou deux zones peuvent cependant coïncider : le nombre de systèmes en présence est donc au moins égal au nombre de traits ou zones observés (Merklen et *al.*, 1973).

### 5.6.L'immunodiffusion double d'Ouchterlony

La méthode de double diffusion en gel d'Ouchterlony est une méthode d'immunoprécipitation fondée sur la diffusion d'antigènes et d'anticorps en milieu solide (en général un gel d'agarose) ne contenant initialement ni antigènes ni anticorps. La diffusion se fait à partir de puits placés en vis-à-vis, contenant pour les uns des solutions d'antigènes et pour les autres des sérums immuns ou non, selon qu'il s'agisse de techniques de diagnostic ou de dosage.

Lorsque les molécules d'anticorps rencontrent les molécules d'antigènes, la liaison antigène-anticorps conduit à la précipitation des complexes immuns dans la zone de rencontre, si l'anticorps reconnaît l'antigène (Figure 10). Le précipité se forme au bout de 24 à 48 heures dans la zone où les concentrations des deux solutions sont optimales, c'est-à-dire dans la zone d'équivalence. Les précipités se présentent sous la forme d'un arc blanchâtre visible à l'œil nu.

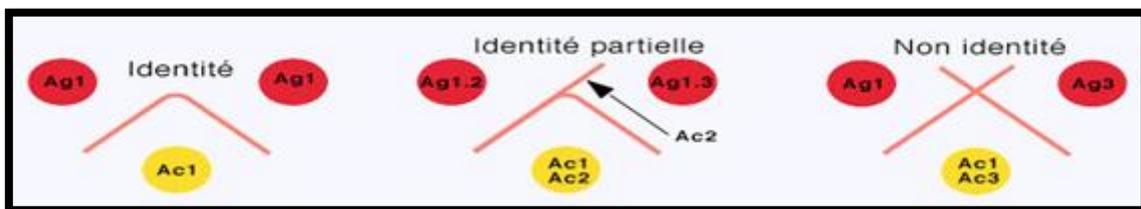


**FIGURE 7 :** Principe de la technique d'Ouchterlony ([www.pedagogie.ac-nantes.fr](http://www.pedagogie.ac-nantes.fr))

Cette technique permet le dénombrement des antigènes contenus dans un mélange et leur identification (diagnostic), elle permet également le dosage des antigènes et des anticorps :

- Dénombrement des antigènes : Le nombre de zones de précipitation correspond au nombre minimal d'antigènes réagissant, le nombre d'antigènes présents pouvant toujours être plus grand que le nombre de zones de précipitation si l'on tient compte du fait que certains antigènes peuvent ne pas donner de zone visible ou distincte.

- Identification des antigènes : Cela peut se faire par l'étude des réactions de voisinage en plaque. Lorsqu'un même antigène est présent dans des puits voisins, les zones de précipitation n'en feront qu'une seule (coalescence). Il s'agira donc d'identité antigénique totale. Si les antigènes n'ont aucun déterminant commun et sont donc totalement différents, les zones de précipitation se coupent mutuellement. Enfin, en cas de présence de déterminants communs entre deux antigènes ayant par ailleurs des déterminants spécifiques de chacun d'eux, on observera une coalescence partielle qui se traduit par la formation d'un éperon entre les zones réagissantes et par un affaiblissement de l'intensité du précipité au-delà du point de jonction des deux zones (Figure 12).



**FIGURE 8: Double diffusion en milieu gélifié : Interprétation des lignes de précipités**  
(<http://nte-serveur.univ-lyon1.fr>)

Cette méthode permet de comparer les épitopes portés par différents antigènes ou de vérifier la pureté d'une préparation antigénique. La position du précipité dépend de la concentration relative des antigènes et des anticorps, il s'agit d'une méthode semi-qualitative.

Villemot & Provost (1958), ont été les premiers à démontrer la présence dans les tissus rabiques de deux fractions précipitables. La méthode mise au point consistait à découper de petits réservoirs dans la gélose coulée dans une boîte de Petri et à les remplir de matière cérébrale rabique d'une part et d'immun sérum d'autre part. L'antigène soluble et l'anticorps précipitant diffusent l'un vers l'autre à travers le milieu gélifié et donnent un complexe qui précipite en formant deux lignes nettement visibles à l'œil nu.

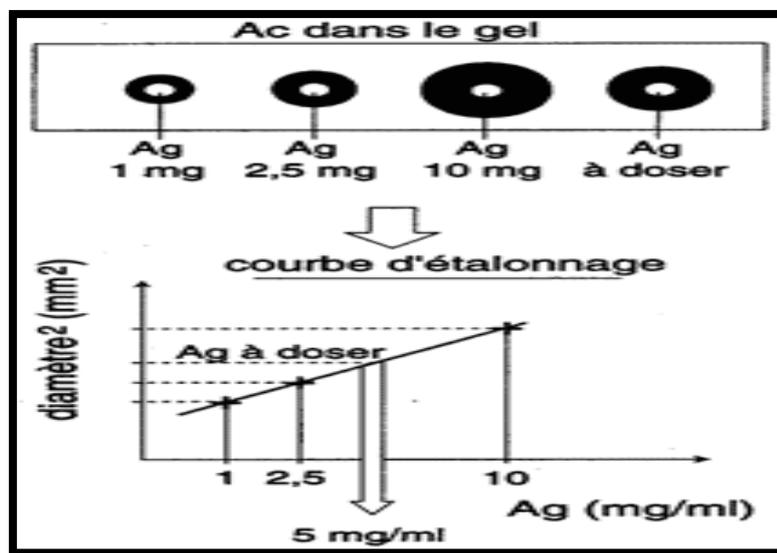
Une microprécipitation sur lame a été décrite pour la première fois par Scheidegger en 1955, puis adaptée à l'étude du poliovirus par Grasset et *al.* (1958). Une variante utilisable avec les cultures de virus rabique en tissus a été mise au point par Grasset et Atanasiu (1961).

### 5.7. Immunodiffusion radiale de Mancini

La technique d'immunodiffusion radiale permet de quantifier une molécule, en utilisant la réaction de liaison antigène-anticorps (Lefranc, 2003).

L'anticorps est inclus dans le gel encore chaud et coulé sur une boîte de Petri ou plaque en verre, une gélose à 1,5% préparée en solution tamponnée (pH 8,6) contenant un antiseptique (azide de sodium) est utilisée. Dans des puits creusés dans l'agarose, des quantités variables et connues de l'antigène sont introduites sous le même volume de liquide dans une partie des réservoirs. L'antigène diffuse et forme avec l'anticorps des anneaux de précipitation dont le diamètre est proportionnel à la concentration de l'antigène (plus la concentration en antigène est importante dans le puits plus l'anneau de précipitation formé sera grand).

A partir des diamètres autour de ces réservoirs, on trace une courbe d'étalonnage. En effet, le diamètre de chaque anneau de précipitation est fonction de la concentration en antigène. Il existe une relation entre la concentration de l'antigène et le carré du diamètre des anneaux (Figure 9).



**FIGURE 9** : Principe de la technique de Mancini ([www.imgt.org](http://www.imgt.org))

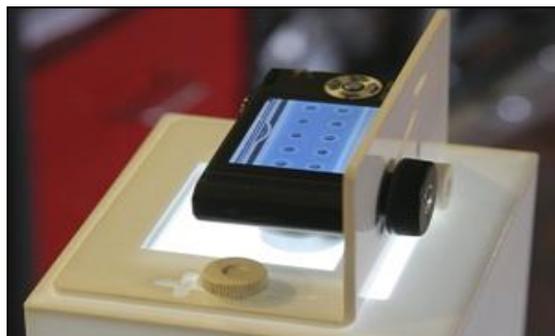
Dans les autres réservoirs, on introduit sous le même volume des échantillons à examiner. Les surfaces mesurées sont reportées sur la courbe d'étalonnage et fournissent la quantité d'antigène dans l'échantillon. Il est nécessaire que la gamme des concentrations utilisées pour l'étalonnage comprenne les valeurs extrêmes susceptibles d'être retrouvées par

le dosage. L'antigène entrant dans la réaction doit renfermer des quantités suffisantes de virus et l'anticorps doit être présent à une concentration suffisante pour que la réaction donne lieu à un précipité visible (Lépine, 1967).

L'expansion de l'anneau atteint un point d'extrémité et s'arrête lorsque les antigènes et les anticorps atteignent l'équivalence, cependant, la clarté et la densité du bord extérieur peuvent continuer à augmenter. En outre, la température influe sur le taux d'expansion, mais n'affecte pas la taille de l'anneau à son point d'extrémité (Mancini et *al.*, 1965). Des fluctuations importantes de la température ambiante font apparaître des cercles concentriques.

La diffusion de l'antigène demande 12 à 36 heures et est fonction de la composition du gel et des concentrations respectives d'antigène et d'anticorps. Cette méthode est éventuellement applicable aux anticorps.

La mesure des surfaces peut être obtenue par lecture du diamètre sur fond noir gradué, le contour des anneaux peut être rendu plus net par coloration ou en utilisant un lecteur numérique permettant une interprétation rapide et aisée des résultats obtenus. Les lecteurs sont composés d'un appareil photo numérique et d'un logiciel qui calcule automatiquement les diamètres des anneaux de précipitation et édite les résultats dans un rapport d'analyse. Ce système présente plusieurs avantages dont le gain de temps et de précision analytique, la traçabilité complète de l'analyse, la facilité d'utilisation et le calcul automatique des résultats.



**FIGURE 10** : Lecteur de plaques IDR (IDRing® Plates) ([www.idbiotech.fr](http://www.idbiotech.fr))

La principale difficulté de la méthode d'immunodiffusion radiale est l'obtention d'une concentration uniforme de l'anticorps dans la plaque de gélose et surtout d'une couche parfaitement plane et d'épaisseur identique.

On peut augmenter la sensibilité de la méthode par l'emploi d'antisérums très dilués et de plaques de gélose très mince ; cependant, ces artifices sont limités par la difficulté

rencontrée dans l'appréciation des limites du précipité dans le premier cas et par l'exagération des erreurs liées à la non-uniformité de la couche de gélose dans le second cas.

D'après Mancini, la méthode d'immunodiffusion radiale peut mesurer 2.5 ng d'antigènes, soit une concentration de 1.25 mg/l. L'erreur expérimentale de la méthode peut être réduite de plus au moins 2% (Merklen et *al.*, 1973).

Cette technique a été utilisée dans les années 1975 et 1977 pour la détermination des antigènes inactivés dans les vaccins contre le virus de la grippe (Schild et *al.*, 1975; Wood et *al.*, 1977) et le poliovirus (Schild et *al.*, 1980). Ferguson et Schild furent les premiers à l'avoir utilisée en 1982, pour le dosage des vaccins antirabiques produits sur culture cellulaire.

# **Réalisation Expérimentale**

# **Chapitre II**

## **Matériels et Méthodes**

L'appréciation de la valeur antigénique des vaccins antirabiques inactivés à usage humain et vétérinaire est d'une très grande importance car elle permet d'évaluer le degré d'efficacité de ces derniers. Pour ce faire, plusieurs méthodes ont été mises au point.

Les méthodes utilisées *in-vivo* demandent beaucoup de temps et présentent quelques inconvénients comme la variabilité de leurs résultats, l'emploi de la souche virulente CVS et l'utilisation de la voie intracérébrale comme voie d'introduction. Les laboratoires de recherche ont donc développé des techniques *in-vitro* dites alternatives afin de s'affranchir de l'utilisation des souris, parmi elles, la technique d'immunodiffusion radiale.

### **1. Objectif de l'étude**

La technique d'immunodiffusion radiale a été utilisée pour la première fois en 1982 par Ferguson et Schild dans le contrôle des vaccins antirabiques inactivés produits sur culture cellulaire, depuis les recherches n'ont pas cessé pour faire d'elle une technique de remplacement dans le contrôle des vaccins antirabiques.

Dans le but de suivre l'évolution en matière de recherche appliquée se faisant dans les laboratoires à travers le monde et essayer ainsi de continuer à fournir des solutions dans le domaine de l'amélioration et le contrôle des vaccins antirabiques, nous avons tenté au cours de ce travail, dans un premier temps, de mettre au point la technique d'IDR au niveau du laboratoire de Production de Vaccins et Sérum Antirabique de l'IPA afin de l'appliquer par la suite dans le contrôle des vaccins antirabiques inactivés produits sur cerveaux de souris par l'IPA.

Dans un deuxième temps, une étude comparative a été menée avec le test des NIH (test utilisé pour le contrôle des vaccins antirabiques au niveau du laboratoire) dans le but de mieux apprécier l'efficacité de la technique d'IDR et voir ainsi si cette technique est assez fiable pour éventuellement remplacer le test des NIH ou du moins l'utiliser pour prédire les résultats du test des NIH en un temps plus court.

### **2. Période et lieu de l'étude**

Notre travail a été réalisé à l'Institut Pasteur d'Algérie, annexe de Kouba (IPK), au sein du laboratoire de virologie « Production de Vaccins et Sérum Antirabique » durant la période s'étalant du **02/11/2011** au **15/03/2013**.

### 3. MATERIELS

#### 3.1. Matériels biologiques

##### Les vaccins

Les vaccins testés sont des vaccins antirabiques inactivés non adjuvés à usage humain produits avec la souche virale Louis Pasteur-Saigon (LPS) inoculée à des souriceaux et inactivée à la  $\beta$ -propiolactone (cf annexe 4). Ils se présentent sous forme lyophilisée en flacon unidosé accompagné d'un solvant.

Tous les lots de vaccins antirabiques à usage humain en cours de validité disponibles au niveau du laboratoire virologie du service Rage durant notre expérimentation ont été soumis au test d'immunodiffusion radiale de Mancini afin de déterminer leurs valeurs antigéniques, soit un nombre de 71 lots de vaccins dont la valeur antigénique est connue (par le test des NIH) et six autres lots de vaccins produits récemment et dont la valeur antigénique n'est pas connue (test des NIH non fait au moment du test IDR).

##### Les virus

Certaines souches de virus rabique disponibles au niveau du laboratoire et utilisées pour la production de vaccins antirabiques à usage humain et vétérinaire ont été testés.

- **La souche ERA** (*Evelyn-Rokitnicki-Abelseth*), produite sur culture cellulaire et utilisée pour la production de vaccins à virus vivant pour usage vétérinaire.
- **La souche LPS** (*Louis Pasteur-Saigon*), produite sur encéphale de souriceaux à la mamelle, elle est utilisée pour la production de vaccins inactivés destinés à l'usage humain.
- **La souche CVS** (*Challenge Virus Standard*), utilisée dans le test des NIH comme virus d'épreuve.
- **Le mélange ERA/LPS** utilisé en recherche et développement.

##### Les immuns sérums antirabiques

Les immuns sérums antirabiques disponibles ont été, eux aussi testés :

- L'immun sérum antirabique IPA

Il s'agit d'un immun sérum hétérologue purifié, produit sur équins hyperimmunisés avec la souche *Louis Pasteur-Saigon* et purifié par voie enzymatique (pepsine). Il contient des

fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobulines équine rabiques. L'immun sérum brut est fabriqué au niveau du laboratoire de production de vaccins et sérum antirabiques. Le laboratoire des sérums thérapeutiques est chargé lui de la purification. Nous avons utilisé le lot N° 50512, qui possède un titre neutralisant de 255 UI/ml et un taux de protéines de 30,81µg/ml (cf annexe 5).

- L'immun sérum antirabique **Butantan**<sup>®</sup>

Cet immun sérum est fabriqué par l'institut Butantan de Sao Paulo au Brésil. Il contient la fraction F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobulines spécifiques et purifiées obtenues à partir du plasma d'équins hyperimmunisés avec du virus fixe, souche PV, qui est répliquée en culture cellulaire. Ce sérum titre au minimum 200UI/ml (lot : 0803033) (cf annexe 6).

- L'immun sérum antirabique **Vinrab**<sup>®</sup>

Fabriqué par VINS Bioproducts Limited en Inde, il contient des fragments d'immunoglobulines équine rabiques avec un titre minimum de 200UI/ml (lot : 08AR21011) (cf annexe 7).

- L'immun sérum antirabique **Favirab**<sup>®</sup>

Fabriqué par Sanofi Pasteur, il contient des fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobulines équine rabiques. L'immun sérum titre au minimum 200UI/ml (lot : G 9709) (cf annexe 8).

- L'immun sérum antirabique **SII**<sup>®</sup>

Fabriqué par Serum institute of India. Il s'agit d'un immun sérum purifié produit sur équins qui titre au minimum 200UI/ml (lot : EU10.001).

### **Animaux**

Nous avons utilisé des souriceaux à la mamelle âgés de 4 jours et des souris blanches albinos NMRI.

### **Réactifs**

Les réactifs utilisés sont donnés en annexe 9.

## **4. METHODES**

### **4.1. Recherche des anticorps spécifiques dans les immuns sérums par la technique d'immunodiffusion double d'Ouchterlony**

Dans un premier temps nous avons travaillé avec la technique d'immunodiffusion double d'Ouchterlony afin de faire une présélection des immuns sérums et des souches virales à utiliser dans la technique d'immunodiffusion radiale de Mancini. En effet, la méthode d'Ouchterlony nous permet de mettre en évidence les souches virales et les immuns sérums qui permettent la formation d'arcs de précipitation.

Cette technique nous permet également de comparer le comportement d'un antigène rabique préparé sur matière cérébrale par rapport à un antigène rabique préparé sur culture cellulaire et s'assurer ainsi de la formation de complexes comme pour les antigènes produits sur culture cellulaire.

Une fois les résultats de cette technique qualitative connus, nous sommes passés à la deuxième technique quantitative soit l'immunodiffusion radiale de Mancini.

#### **4.1.1. Mode opératoire**

##### **4.1.1.1. Préparation de la gélose**

La gélose a été préparée selon le mode opératoire suivant :

- Un gramme de gélose lyophilisée est reconstitué dans 100 ml de tampon PBS (pH = 7,03 à 30°C). Le mélange est porté à ébullition dans de l'eau bouillante pendant 15 minutes jusqu'à homogénéisation.
- Au moyen d'une éprouvette en verre ou en plastique, un volume de 30 ml du mélange est versé dans les boîtes de Petri disposées sur un plan horizontal. Après un début de gélification à température ambiante, les boîtes sont maintenues à + 4°C pendant 30 minutes pour permettre à la gélose de passer à l'état solide.
- La quantité de gélose à utiliser par boîte de Petri de 90 mm de diamètre a été déterminée après plusieurs essais afin que les puits puissent contenir 50 µl de solution d'antigènes ou d'anticorps.
- À l'aide d'un emporte pièce constitué d'un segment métallique d'un diamètre de 4 mm relié à un système de pompe à vide (Figure 11), des puits en doublets (Figure 12) sont réalisés dans la gélose pour recevoir les solutions d'antigènes et d'anticorps, la gélose

aspirée est recueillie dans un flacon piège. La distance entre les réservoirs d'un doublet est de 1cm.



**FIGURE 11** : Dispositif d'aspiration de la gélose pour créer les puits

(Photos personnelles)



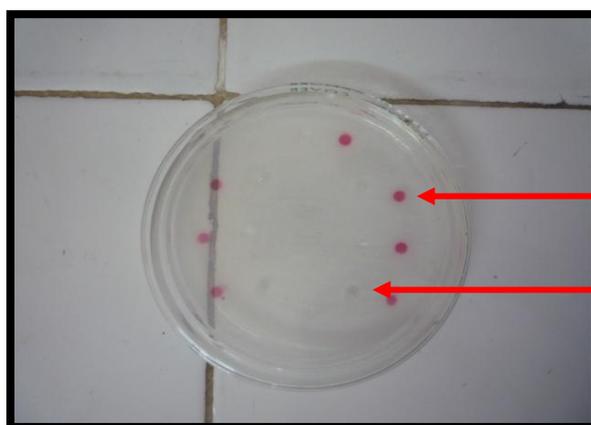
Un doublet

**FIGURE 12** : Puits disposés en doublets

#### 4.1.1.2. Dépôt des solutions d'antigènes et d'anticorps - incubation

Les suspensions virales et les immuns sérums utilisés sont décongelés dans un récipient métallique contenant des poches de glace pour éviter l'action négative de la température sur les virus.

A l'aide d'une micropipette, et après agitation au vortex, 50 $\mu$ l de chaque suspension virale ou d'immun sérum à tester est déposée dans le puits correspondant préalablement marqué, les réservoirs doivent être remplis jusqu'à la surface de la gélose sans jamais déborder afin d'éviter une "contamination" des puits et par conséquent des résultats erronés (Figure 13).

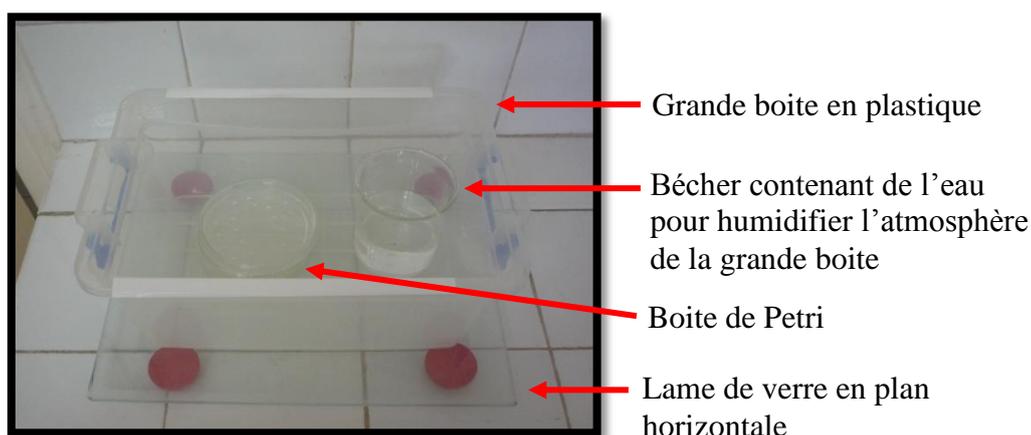


Virus

Immun Sérum (clair)

**FIGURE 13** : Dépôt des solutions d'Ag et d'Ac dans les puits en doublets (photo personnelle)

Les boîtes de Petri contenant les solutions d'Ag et d'Ac sont incubées dans une grande boîte en plastique qui se ferme hermétiquement. A l'intérieur de la boîte, on place un béccher rempli d'eau pour maintenir une atmosphère humide et éviter ainsi la dessiccation de la gélose. La boîte est déposée sur un plan horizontal et laissée à température ambiante pendant 96 heures au maximum (Figure 14).



**FIGURE 14 : Incubation des boîtes de Petri à température ambiante (photo personnelle)**

### 4.1.1.3. Lecture des résultats

Les lectures se font après 24, 48 et 72 heures d'incubation, toujours à la même heure et à contre jour. Dans le cas d'un résultat positif, des arcs blanchâtres apparaissent entre deux réservoirs, ces arcs sont visibles à l'œil nu mais ils peuvent également être mis en évidence par une coloration au bleu de Coomassie.

Les arcs sont difficiles à repérer au début mais avec le temps, ils deviennent de plus en plus faciles à voir. Si au bout de 96 heures aucun arc de précipitation n'est perçu, le résultat est considéré comme négatif.

Tous les tests de la méthode d'Ouchterlony sont refaits à trois reprises pour s'assurer de leur reproductibilité.

### 4.1.1.4. Coloration des géloses

La coloration de la gélose se fait dans une solution à base de bleu de Coomassie et la décoloration dans une solution spéciale à base d'alcool et d'acide (cf annexe 9) selon le protocole suivant :

- Laisser tremper la gélose dans un tampon PBS pendant 24 heures pour éliminer les antigènes et les anticorps non liés.

- Mettre la gélose dans un bain de colorant pendant 30 minutes en agitant de temps en temps.
- Procéder à la décoloration par trois bains successifs dans la solution de décoloration pendant 5 à 10 minutes environ ; cette dernière passera de l'incolore à une coloration bleu.
- Laisser la gélose dans la solution de décoloration pendant 24 heures à l'intérieur d'une boîte bien fermée.

#### **4.1.2. Tests de précipitation des immuns sérums antirabiques purifiés**

Les différents immuns sérums antirabiques purifiés sont testés vis-à-vis des différents virus disponibles au niveau du laboratoire dans le but de déterminer les combinaisons immuns sérums/virus qui permettent la formation d'arcs de précipitation.

Il est à noter que les dilutions des virus ont été faites uniquement lorsqu'on aboutit à des résultats négatifs, d'autre part toutes les géloses n'ont pas été colorées au bleu de Coomassie du fait que les arcs de précipitation sont bien visibles sans coloration.

##### **4.1.2.1. Test de précipitation de l'immun sérum antirabique IPA vis-à-vis de divers virus rabiques**

L'immun sérum antirabique purifié IPA est testé pur vis-à-vis du virus ERA inactivé et vivant (pur et après dilutions), du virus LPS vivant et inactivé, du mélange ERA/LPS vivant et inactivé et de la souche CVS.

##### **4.1.2.2. Test de précipitation de l'immun sérum antirabique Butantan<sup>®</sup> vis-à-vis de divers virus rabiques**

L'immun sérum antirabique Butantan<sup>®</sup> est testé pur vis-à-vis du virus ERA inactivé et vivant pur, du virus LPS vivant et inactivé (pur et avec dilutions), du mélange ERA/LPS vivant et inactivé et de la souche CVS.

##### **4.1.2.3. Test de précipitation de l'immun sérum antirabique Vinrab<sup>®</sup> vis-à-vis du virus ERA**

L'immun sérum antirabique Vinrab<sup>®</sup> n'a été testé que vis-à-vis du virus ERA vivant pur et après dilutions.

#### **4.1.2.4. Test de précipitation de l'immun sérum antirabique Favirab<sup>®</sup> vis-à-vis du virus ERA**

L'immun sérum antirabique Favirab<sup>®</sup> n'a, lui aussi, été testé que vis-à-vis du virus ERA vivant pur.

#### **4.1.2.5. Test de précipitation de l'immun sérum antirabique SII<sup>®</sup> vis-à-vis de divers virus rabiques**

L'immun sérum antirabique SII<sup>®</sup> a été testé vis-à-vis de la souche CVS et du mélange ERA/LPS.

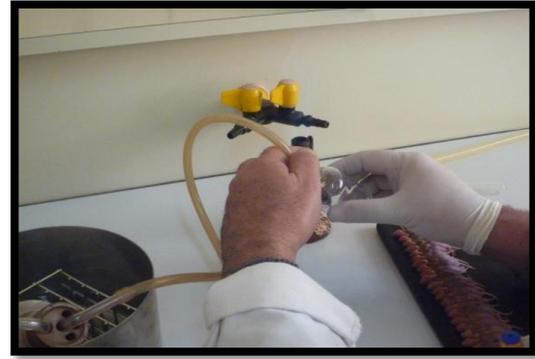
#### **4.1.2.6. Test de précipitation de la matière cérébrale de souriceaux témoins**

La matière cérébrale (MC) de 22 souriceaux non inoculés a été testée vis-à-vis de deux immuns sérums antirabiques, l'immun sérum antirabique de l'IPA et celui du laboratoire Butantan<sup>®</sup> afin de vérifier si les protéines contenues dans la matière cérébrale réagissent ou non avec les immuns sérums.

#### **✚ Préparation de la matière cérébrale de souriceaux témoins**

La matière cérébrale de 22 souriceaux de 7 jours d'âge non inoculés et euthanasiés a été récoltée par aspiration de cette dernière avec un système de pompe à vide. Quatre grammes et demi de matière cérébrale ont été ainsi récoltés dans un flacon contenant 10 ml de Kanamycine afin d'éviter les contaminations (Figure 15). La suspension à 45% de MC est ensuite congelé à une température de  $-70^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment du test.

Au moment de faire le test, la matière cérébrale est décongelée, broyée avec du sable stérile (Figure 16) puis clarifiée à 4000 trs/min pendant 30 minutes à  $+4^{\circ}\text{C}$  (avec une centrifugeuse réfrigérée Jouan BR4i). Le surnageant (Figure 17) obtenu est filtré sur une compresse stérile puis soumis à un test d'immunodiffusion double avec l'immun sérum antirabique de l'IPA et celui du laboratoire Butantan<sup>®</sup>.



**FIGURE 15 :** Aspiration de la matière cérébrale des souriceaux témoins et ajout de la kanamycine (Photos personnelles)



**FIGURE 16 :** Broyage de la matière cérébrale avec du sable stérile (Photos personnelles)



**FIGURE 17 :** Pot contenant les 3 phases après centrifugation

← Surnageant  
← Culot de MC  
← Sable

#### **4.1.2.7. Test de précipitation d'immuns sérums récoltés sur des souris hyperimmunisées**

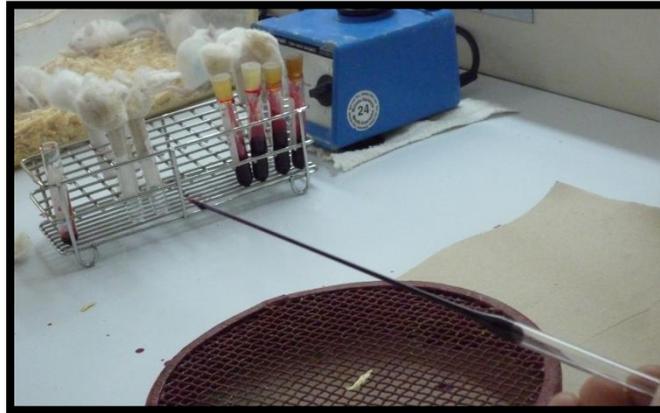
Trois groupes de 20 souris ont été hyperimmunisées avec cinq injections de 0,5 ml de différentes suspensions virales par voie intra péritonéale, l'intervalle entre les injections est de 7 jours :

- Le premier groupe a reçu du virus ERA vivant
- Le deuxième groupe a reçu du virus LPS inactivé
- Le troisième groupe a reçu le mélange ERA/LPS inactivé

Une prise de sang au niveau du sinus rétro-orbitaire a été réalisée une semaine après la dernière injection pour chaque groupe de souris sur des tubes secs (Figure 18). Les tubes sont

placés dans un bain marie à 37°C pendant une heure puis défibrinés et laissés 24 heures à +4°C. Les tubes sont ensuite centrifugés à 2000 trs/min pendant 20 minutes.

Chacun des trois virus utilisés pour immuniser les souris (virus ERA vivant, virus LPS inactivé et le mélange ERA/LPS inactivé) est testé vis-à-vis de chacun des trois immuns sérums récoltés sur les groupes de souris (immun sérum anti-ERA, immun sérum anti-LPS et immun sérum anti-ERA/LPS).



**FIGURE 18: Récolte de sang chez les souris**  
(Photo personnelle)

#### **4.2. Détermination de la valeur antigénique des vaccins par la technique d'immunodiffusion radiale de Mancini**

En se basant sur les résultats obtenus avec les différents tests de la technique d'immunodiffusion double d'Ouchterlony, nous avons essayé de mettre au point la technique d'immunodiffusion radiale de Mancini pour le contrôle de l'activité des vaccins antirabiques tissulaires inactivés.

##### **4.2.1. Choix des produits utilisés**

Le choix des produits à utiliser a été élaboré en fonction des résultats obtenus par la technique de Mancini.

##### **✚ Les immuns sérums**

Notre choix s'est porté sur l'utilisation de l'immun sérum antirabique hétérologue purifié IPA (lot N° 50512, titre : 255 $\mu$ l/ml, taux de protéines : 30,81  $\mu$ g/ml) pour la réalisation des tests d'immunodiffusion radiale.

### **Les vaccins**

Nous avons testés les 77 vaccins antirabiques inactivés à usage humain produits par l'IPA et disponibles au niveau du laboratoire durant notre expérimentation par la technique d'immunodiffusion radiale pour déterminer leurs valeurs antigéniques (VA).

#### **4.2.2. Mise au point de la technique**

Les tests d'immunodiffusion radiale (IDR) ont été réalisés sur des plaques en plastique de 12 cupules (NUNC), le diamètre d'une cupule étant de 2,5 cm. Chaque cupule est remplie avec 2,8 ml de gélose contenant une quantité connue d'immun sérum antirabique IPA. La quantité de gélose à mettre par cupule a été calculée de manière à ce que les puits puissent contenir 50 µl de vaccin.

Les résultats obtenus après les tests de la technique d'Ouchterlony nous ont dicté le choix de la souche rabique à utiliser. En effet, il s'est avéré que seule la souche rabique LPS donnait des résultats positifs reproductibles avec l'immun sérum antirabique IPA.

##### **4.2.2.1. Détermination de la quantité d'immun sérum antirabique IPA à incorporer dans la gélose à 1 %**

- Après avoir préparé une gélose à 1%, 14 tubes en verre sont disposés dans un portoir placé dans un bain marie réglé à 50°C afin de les préchauffer, les tubes sont au préalable identifiés avec le numéro d'une cupule ainsi, chaque tube correspond à une cupule.
- A l'aide d'une pipette en verre de 5 ml munie d'une poire et préalablement préchauffée, on introduit dans chaque tube une quantité de gélose bien déterminée comme mentionné dans le tableau 5. Les tubes sont laissés pendant environ 15 minutes au bain marie à 50°C. La température de la gélose, initialement à 100°C, va baisser, l'incorporation de l'immun sérum (IS) pourra ainsi se faire dans les conditions idéales.
- Quand la température de la gélose aura atteint les 50°C, à l'aide d'une micropipette réglable, on procède aux ajouts d'immun sérum dans les tubes.
- Chaque tube est ensuite soumis à une bonne agitation au vortex afin d'homogénéiser le mélange gélose/IS, cette étape est importante en particulier lorsque la quantité

d'immun sérum antirabique incorporée est moindre. Aussitôt après, le contenu de chaque tube (gélose + IS antirabique) est versé dans la cupule correspondante.

- Après gélification de la gélose, un puits central est percé dans chaque cupule et 50µl de virus LPS inactivé y sont alors déposés.
- La plaque ainsi préparée est incubée dans une grande boîte en plastique fermée hermétiquement et contenant un béccher rempli d'eau. La boîte doit être posée sur un plan horizontal, à température ambiante, pendant 96 heures au maximum pour permettre la diffusion des antigènes rabiques.

**TABLEAU 5 : Volumes d'immun sérum antirabique IPA à incorporer dans la gélose à 1%**

Numéro de cupules	Volume de gélose à 1% (ml)	Volume d'IS antirabique IPA incorporé (µl)
1	2,8	15
2	2,8	20
3	2,8	30
4	2,8	40
5	2,8	50
6	2,7	100
7	2,65	150
8	2,60	200
9	2,55	250
10	2,5	300
11	2,45	350
12	2,4	400
13	2,35	450
14	2,3	500

Après examen des résultats obtenus, nous avons été contraints d'augmenter la concentration de la gélose à 2% ainsi que les quantités d'immuns sérums à incorporer.

#### **4.2.2.2. Détermination de la quantité d'immun sérum antirabique IPA à incorporer dans la gélose à 2 %**

Nous avons repris le même protocole opératoire que précédemment, mais en utilisant une gélose à 2%, bien évidemment les quantités d'immun sérum antirabique à incorporer ont été également modifiées.

Les quantités de gélose à 2% et d'immun sérum antirabique correspondantes à incorporer dans chaque cupule sont rassemblées dans le tableau 6. La quantité de gélose a été modifiée de façon à avoir un volume final (gélose + IS antirabique) de 2,8 ml. Dans ce cas également les tests sont réalisés en utilisant le virus LPS inactivé.

**TABLEAU 6 : Volumes d'immun sérum antirabique IPA à incorporer dans la gélose à 2%**

Numéro de cupules	Volume de gélose à 2% (ml)	Volume d'IS antirabique IPA incorporé (µl)
1	2,3	500
2	2,2	600
3	2,1	700
4	2	800
5	1,9	900
6	1,8	1000
7	1,7	1100
8	1,6	1200
9	1,5	1300
10	1,4	1400

Après lecture des résultats, nous nous sommes proposés de travailler avec 1,4 ml d'immun sérum antirabique IPA soit un taux de protéines de 15,4 µg/ml incorporé à 1,4 ml de gélose à 2%. Tous les tests seront donc faits avec ces paramètres fixés dans ces conditions.

#### **4.2.2.3.Détermination du nombre de flacons de vaccins à reconstituer**

Les premiers tests ont été réalisés en reconstituant 4 flacons de vaccins avec 1 ml de tampon PBS, au vu des résultats obtenus, nous nous sommes rendus compte que la concentration d'antigènes vaccinaux dans le puits était trop forte, nous avons alors réalisé d'autres tests en réduisant le nombre de flacons de vaccins à 3, 2 et 1 flacons de vaccins reconstitués à chaque fois avec 1 ml de tampon PBS.

#### **4.2.3. Mode opératoire**

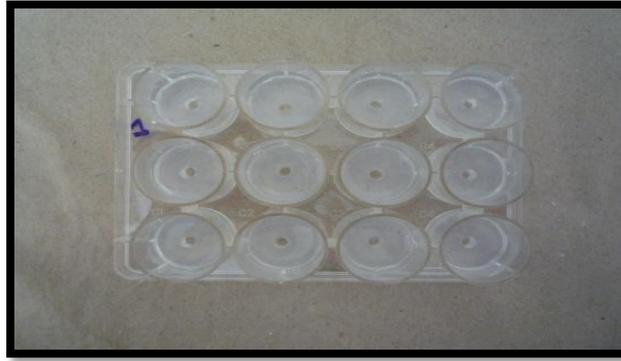
##### **4.2.3.1.Préparation de la gélose à 2%**

- Deux grammes d'agarose lyophilisée sont reconstitués dans 100 ml d'un tampon PBS (pH= 7,03 à 30°C). Le mélange est porté à ébullition dans un bain marie pendant 30 minutes jusqu'à homogénéisation du mélange.

- Nous procédons ensuite au transfert de 18 ml de gélose chaude dans un flacon en verre préalablement préchauffé au bain marie à 50°C. Cette opération qui permet d'abaisser la température de la gélose à 50°C va permettre d'une part, une meilleure conservation de l'immun sérum antirabique au moment de son incorporation dans la gélose, et d'autre part, le maintien de la gélose dans un état liquide. La température de la gélose est surveillée avec un thermomètre placé dans le flacon contenant la gélose.
- Lorsque la température de la gélose atteint les 50°C, une même quantité d'IS antirabique, soit 18 ml, y est rajoutée tout en conservant le flacon dans le bain marie.
- Il est important de procéder à une bonne homogénéisation du mélange gélose/IS antirabique car l'une des principales difficultés de l'immunodiffusion radiale est d'arriver à une répartition homogène et uniforme de l'immun sérum antirabique dans toute la gélose.
- La plaque en plastique de 12 cupules est déposée sur un plan horizontal puis à l'aide d'une pipette en verre de 5 ml préchauffée et munie d'une poire, on prélève 2,8 ml du mélange gélose/IS antirabique que l'on introduit dans chacune des 12 cupules (Figure 19). Chaque pipette est rincée avant son utilisation avec de l'eau distillée portée à une température avoisinant les 50°C afin d'éviter tout refroidissement du mélange gélose/IS antirabique au contact du verre. Une même pipette est utilisée pour remplir 3 cupules au maximum.
- Après un début de gélification à température ambiante, la plaque est maintenue à +4°C pendant 30 minutes afin d'obtenir un état solide de la gélose. Un seul puits est creusé au centre de chaque cupule (Figure 20), avec le même emporte pièce utilisé pour percer les puits dans la technique d'Ouchterlony.



**FIGURE 19:** Etapes de remplissage des cupules avec le mélange gélose/IS antirabique IPA (Photos personnelles)



**FIGURE 20 :** Aspect de la plaque après perçage des puits centraux  
(Photo personnelle)

#### 4.2.3.2. Dépôt des vaccins et incubation

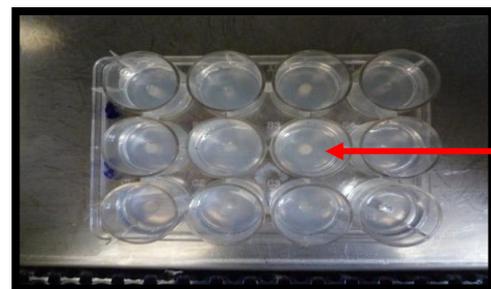
Les vaccins à tester sont retirés du réfrigérateur juste avant leur utilisation, ils sont mis dans un récipient métallique contenant des poches de glaces pour les maintenir au frais.

A l'aide d'une micropipette, 50µl de vaccins reconstitués (pur et dilués) sont déposés dans chaque puits, les réservoirs doivent être remplis jusqu'à la surface de la gélose sans jamais déborder (Figure 22).

Les plaques dont les cupules ont reçu les échantillons de vaccins sont incubées dans une grande boîte en plastique avec à l'intérieur un béccher rempli d'eau pour éviter la dessiccation de la gélose. La boîte est déposée sur un plan horizontal et laissée à température ambiante pendant 96 heures.



**FIGURE 21 :** Préparation des dilutions  
des vaccins avec un tampon PBS  
(Photos personnelles)



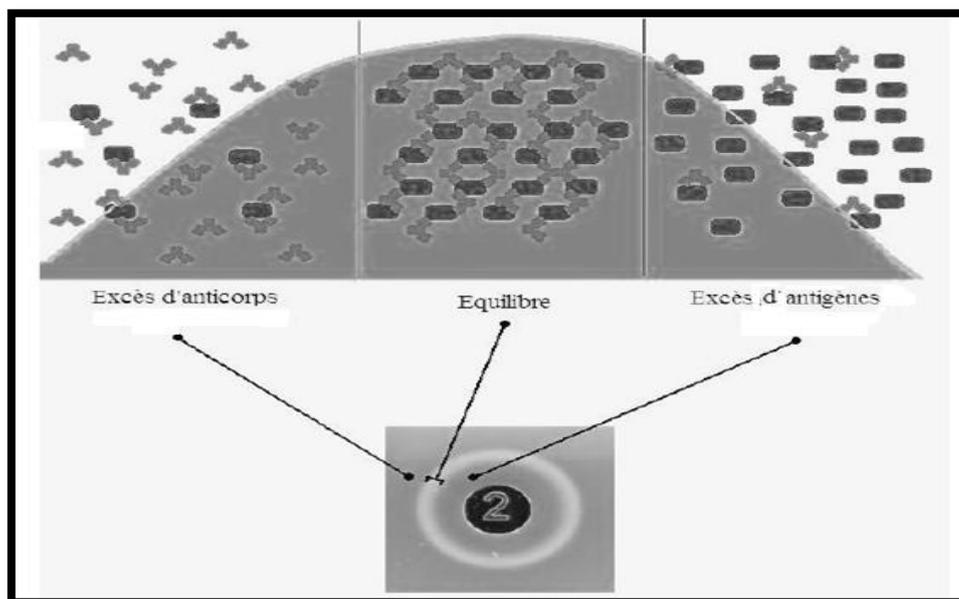
Aspect nacré

**FIGURE 22 :** Aspect de la plaque  
après dépôt des vaccins

#### 4.2.3.3. Lecture des résultats

Les lectures se font après 24, 48 et 72 heures, à la même heure et à contre jour. Dès qu'un anneau de précipitation apparaît, son diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

Les anneaux de précipitation se forment lorsqu'une situation d'équilibre entre antigènes et anticorps est établie. La figure 23 illustre ce principe et explique la formation des anneaux visibles sur les boîtes de gélose.



**FIGURE 23 : Formation des anneaux de précipitation (Allemand, 2008)**

#### 4.2.3.4. Coloration des géloses

Nous avons suivi le même protocole de coloration et de décoloration utilisé pour colorer les boîtes de Petri dans les tests de précipitation par la technique d'Ouchterlony.

#### 4.2.4. Tests d'immunodiffusion radiale

Plusieurs tests d'immunodiffusion radiale (IDR) ont été réalisés afin de déterminer le nombre de vaccins à reconstituer dans les tests finaux et établir la courbe d'étalonnage définitive à utiliser pour la détermination de la valeur antigénique des vaccins.

Les résultats obtenus avec ces tests nous ont permis de fixer les paramètres à appliquer pour les tests IDR des 77 vaccins antirabiques tissulaires inactivés en vue de déterminer leurs valeurs antigéniques.

#### **4.2.4.1. Test IDR du virus LPS inactivé**

La quantité d'immun sérum antirabique à incorporer dans la gélose étant déterminée, nous avons testé le virus LPS inactivé en faisant les dilutions pour déterminer la concentration la plus faible qui permettrait d'avoir des anneaux de précipitation mesurables, avant de passer au test des vaccins.

Pour ce faire, nous avons préparé une boîte avec 6 cupules, dans chacune d'elles, nous avons mis 1,4 ml de gélose à 2% et 1,4 ml d'IS antirabique IPA. Nous avons procédé à des dilutions du virus à 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32 dans du tampon PBS.

Un puits central est percé dans chaque cupule, puis avec une micropipette, on introduit dans un premier puits 50µl de virus pur et dans les autres 50 µl des différentes dilutions.

#### **4.2.4.2. Test IDR de deux lots de vaccins antirabiques tissulaires inactivés**

Les premiers tests sur les vaccins inactivés ont été faits sur deux vaccins classés forts selon le test des NIH, le S.135 et le S.119. Nous avons fait le choix de reconstituer 4 flacons de chaque vaccin dans 1 ml de tampon PBS pour avoir une forte concentration d'antigènes et optimiser au maximum la réaction de précipitation.

Nous avons suivi exactement les mêmes étapes que pour le test du virus LPS inactivé, là aussi, des dilutions des deux vaccins sont faites en tampon PBS aux 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32.

#### **4.2.4.3. Test IDR du vaccin de référence**

Comme pour les deux autres vaccins, 4 flacons du vaccin de référence S.122 sont reconstitués avec 1 ml de tampon PBS, le vaccin est testé pur et en utilisant les mêmes dilutions que précédemment.

Le vaccin S.122 est le vaccin de référence interne du laboratoire dans le test des NIH, il possède une valeur antigénique de 1,36 contre 36 DL<sub>50</sub> (valeur du virus d'épreuve pendant ce test). Le test a été refait 3 fois pour s'assurer de sa reproductibilité et de la fiabilité des résultats obtenus.

#### **4.2.4.4. Etablissement de la courbe d'étalonnage**

Les résultats obtenus avec le vaccin de référence S.122 nous ont servi au tracé de la courbe d'étalonnage. En effet, le diamètre au carré de chaque anneau de précipitation formé

est proportionnel à la valeur antigénique du vaccin de référence par rapport à la dilution correspondante.

#### **4.2.4.5. Test IDR d'un premier groupe de vaccins**

Nous avons testé 12 vaccins antirabiques inactivés sélectionnés parmi les 71 vaccins disponibles au niveau du laboratoire : quatre vaccins forts (S.138, S.72, S.119, S.135), quatre moyens (S.76, S.90, S.115, S.133) et quatre faibles (S.87, S.111, S.81, S.144) classés ainsi selon les résultats du test des NIH. Les vaccins sont testés pur et dilués avec trois dilutions (1/2, 1/4 et 1/8), pour vérifier si les diamètres des anneaux de précipitation sont fonction des dilutions.

Le but de ce premier essai sur un lot restreint est d'essayer de déterminer la valeur antigénique de ces 12 vaccins en utilisant la courbe d'étalonnage tracée à partir des résultats du vaccin de référence S.122.

#### **4.2.4.6. Test IDR avec un, deux et trois flacons de vaccins reconstitués**

Les résultats obtenus dans le test précédent nous ont conduit à réaliser de nouveaux tests en diminuant la concentration des antigènes vaccinaux dans le puits et ce en reconstituant à chaque fois trois puis deux puis un flacon de vaccin dans 1 ml de tampon PBS.

Sur les 12 vaccins testés précédemment nous avons choisi un vaccin fort (S.72), un vaccin moyen (S.90) et un vaccin faible (S.81).

Chacun de ces trois vaccins a subi trois tests différents. Dans le premier, 3 flacons d'un même vaccin ont été constitués dans 1 ml de tampon PBS, dans le deuxième test nous avons reconstitué 2 flacons de vaccin dans 1 ml de tampon PBS et enfin lors du troisième test un seul flacon de vaccin est reconstitué dans 1 ml de tampon PBS. Pour les 3 tests, le vaccin est testé pur et également après dilutions (1/2, 1/4 et 1/8).

Le vaccin de référence, le S.122 est, lui aussi testé selon le même protocole à trois reprises pour s'assurer de la reproductibilité des résultats. A partir de ces résultats, nous avons établi de nouvelles courbes d'étalonnage pour la détermination de la VA des 3 autres vaccins.

Après lecture et comparaison de l'ensemble des résultats, nous avons retenu le test faisant intervenir deux flacons de vaccins et nous l'avons appliqué pour la réalisation de tous les autres tests ; c'est ainsi qu'une courbe d'étalonnage définitive a été établie en fonction des dilutions du vaccin de référence S.122.

#### **4.2.4.7. Test IDR des différents vaccins antirabiques tissulaires inactivés**

Après avoir fixé les différents paramètres (quantité d'immun sérum antirabique à incorporer dans la gélose à 2% et nombre de flacons de vaccins à reconstituer) nous les avons appliqué à l'ensemble des 71 vaccins antirabiques tissulaires inactivés disponibles au niveau du laboratoire et ayant subit préalablement le test des NIH afin de déterminer leurs valeurs antigéniques.

Chaque vaccin est testé après reconstitution de 2 flacons de vaccin avec 1 ml de tampon PBS, le vaccin est testé pur c'est-à-dire sans dilutions. En effet, pour déterminer la valeur antigénique d'un vaccin, il suffit de reporter le diamètre, élevé au carré, de l'anneau de précipitation formé par le vaccin pur sur la courbe d'étalonnage. La mesure des diamètres est faite à l'aide d'un pied à coulisse.

Dans le but d'être en accord avec la méthode de réception des échantillons dans le test des NIH, nous avons pris au hasard des flacons de vaccins du lot des 71 vaccins disponibles.

Les tests sont réalisés en utilisant les plaques de 12 cupules, 8 vaccins pris au hasard sont testés à la fois. Dans les 4 premières cupules, le vaccin de référence S.122 est testé pur et avec 3 dilutions pour tracer la courbe d'étalonnage. A chaque fois que des vaccins sont testés, le vaccin de référence est lancé en même temps. Ceci permet d'harmoniser la technique.

La plaque en plastique de 12 cupules utilisée pour les tests est identifiée comme suit

A1	A2	A3	A4
B1	B2	B3	B4
C1	C2	C3	C4

**TABLEAU 7 : Tableau récapitulatif des vaccins testés par plaque de 12 cupules**

Cupules	Vaccins testés par plaque								
	Plaque 1	Plaque 2	Plaque 3	Plaque 4	Plaque 5	Plaque 6	Plaque 7	Plaque 8	Plaque 9
A1	S.122 Pur	S.122 Pur	S.122 Pur	S.122 Pur	S.122 Pur	S.122 Pur	S.122 Pur	S.122 Pur	S.122 Pur
A2	S.122 au 1/2	S.122 au 1/2	S.122 au 1/2	S.122 au 1/2	S.122 au 1/2	S.122 au 1/2	S.122 au 1/2	S.122 au 1/2	S.122 au 1/2
A3	S.122 au 1/4	S.122 au 1/4	S.122 au 1/4	S.122 au 1/4	S.122 au 1/4	S.122 au 1/4	S.122 au 1/4	S.122 au 1/4	S.122 au 1/4
A4	S.122 au 1/8	S.122 au 1/8	S.122 au 1/8	S.122 au 1/8	S.122 au 1/8	S.122 au 1/8	S.122 au 1/8	S.122 au 1/8	S.122 au 1/8
B1	S.75	S.91	S.142	S.116	S.88	S.108	S.132	S.100	S.94
B2	S.89	S.76	S.82	S.119	S.70.A	S.138	S.97	S.102	S.110
B3	S.86	S.95	S.70.B	S.120	S.73	S.141	S.126	S.103	S.117
B4	S.90	S.123	S.145	S.136	S.112	S.129	S.130	S.104	S.74
C1	S.81	S.121	S.114	S.139	S.78	S.148	S.79	S.118	S.115
C2	S.71	S.101	S.140	S.72	S.111	S.93	S.80	S.125	S.143
C3	S.107	S.146	S.135	S.85	S.147	S.131	S.106	S.127	S.144
C4	S.98	S.87	S.77	S.92	S.124	S.134	S.99	S.133	-

#### **4.2.4.8. Test IDR de vaccins avant contrôle par le test des NIH**

Au cours de notre expérimentation, il y a eu production de 6 lots de vaccins antirabiques tissulaires inactivés à usage humain dont les résultats du test des NIH n'étaient pas encore connus. Ces vaccins ont été testés par la technique IDR, inversant ainsi la technique d'approche pour s'assurer de la fiabilité de cette technique.

**TABLEAU 8 : Liste des vaccins testés par IDR avant contrôle par le test des NIH**

<b>Cupules</b>	<b>Vaccins testés</b>
A1	S.122 Pur
A2	S.122 au 1/2
A3	S.122 au 1/4
A4	S.122 au 1/8
B1	S.149
B2	S.150
B3	S.151
B4	S.152
C1	S.153
C2	S.154

#### **4.3. Test des national institutes of health (NIH)**

Tous les lots de vaccins antirabiques tissulaires inactivés produits par l'IPA sont contrôlés par le test des NIH selon le protocole suivant :

- Pour chaque vaccin à contrôler, cinq dilutions de raison 5 sont préparées (1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125) dans un soluté physiologique tamponnée au phosphate (pH 7,6). L'intervalle des dilutions est choisi de telle sorte que la dilution médiane contienne assez de vaccin pour protéger 50% des souris, il dépendra de la virulence de la dose d'épreuve, de l'espèce de souris utilisée et du pouvoir immunisant du vaccin.
- Dix souris âgées de 4 semaines et pesant 14 à 16 g sont inoculées par voie intra péritonéale avec 0,5 ml de chacune des dilutions de vaccin. Les souris reçoivent 2 injections à une semaine d'intervalle.

- Un autre groupe de 10 souris reçoit de la même manière le vaccin de référence.
- Toutes les souris sont éprouvées par voie intracérébrale 14 jours après l'administration de la 1<sup>ère</sup> dose de vaccin. les souris immunisées sont éprouvées avec une dilution de virus dont l'expertise courante a montré qu'elle contient entre 5 et 50DL<sub>50</sub>. C'est le laboratoire qui détermine la dilution de CVS de travail qui contient la dose d'épreuve de 5 à 50DL<sub>50</sub>.
- Des dilutions de 10 en 10 du liquide surnageant sont préparées, celle qui contient 1DL<sub>50</sub> dans 0,03 ml sera utilisée pour l'épreuve, le volume injecté par voie IC est de 0,03 ml.
- Trois dilutions du virus d'épreuve (la dose d'épreuve utilisée pour éprouver les souris vaccinées, une dilution au dessus et une en dessous) sont injectées à trois groupes de 10 souris témoins.
- Toutes les souris sont observées pendant 14 jours à partir du jour d'inoculation d'épreuve, seuls les morts survenant après le 5<sup>ème</sup> jour et celles précédées par des signes de rage sont considérées comme ayant succombées à la rage.

Le titre virulent de la dose du virus d'épreuve n'a pas d'importance particulière aussi longtemps qu'il est situé entre 5 et 50DL<sub>50</sub>, il est nécessaire cependant que tous les témoins recevant la dose d'épreuve succombent. A cause de la nature du virus et du test, il est difficile d'obtenir exactement le même titre de virus d'un test à l'autre mais habituellement la différence est maîtrisée de façon à ce qu'elle soit très faible.

Pour que le vaccin soit considéré comme valable, les résultats obtenus après l'épreuve des souris immunisées doivent révéler que les dilutions du vaccin entourent le point 50%, c'est-à-dire que la majorité des souris ayant reçu la dose la plus élevée du vaccin survivent et que la majorité des souris ayant reçu la dose la plus faible du vaccin succombent.

Pour calculer l'activité du vaccin, on utilise la méthode qui nécessite la détermination de la DE<sub>50</sub> (dose efficace 50%). A partir de la DE<sub>50</sub> du vaccin de référence et celle du vaccin à expertiser on détermine la valeur antigénique du vaccin à expertiser, elle doit être d'au moins 0,3 pour que le vaccin satisfasse à l'épreuve.

#### **4.4. Classification des vaccins**

Sur la base des résultats des tests NIH et IDR, les vaccins ont été classés en trois catégories : vaccins forts, vaccins moyens et vaccins faibles.

Il est à noter que la classification pour le test des NIH, et dans le cadre de ce travail, ne s'est pas faite uniquement sur la base de la valeur antigénique, comme c'est le cas pour les tests de l'IDR, mais la  $DL_{50}$  du virus d'épreuve correspondant a été prise en considération.

En principe pour qu'un vaccin passe le test des NIH, il doit avoir une  $VA > 0,3$  avec une  $DL_{50}$  réelle comprise entre 5 et 50. Etant donné que la fourchette des  $DL_{50}$  est grande, la variabilité dans les tests est donc tout aussi grande, c'est ce qui nous a amené à prendre en considération la  $DL_{50}$  du virus d'épreuve dans le test.

En effet, un vaccin peut avoir une  $VA$  faible contre une  $DL_{50}$  élevé, il est par conséquent considéré comme un vaccin fort et non faible. Et vice versa, si un vaccin possède une  $VA$  élevée contre une  $DL_{50}$  faible, il sera considéré comme un vaccin faible.

Si on considère le vaccin S.120, il possède une  $VA$  de 0,4, on pourrait penser que c'est un vaccin faible, mais la  $DL_{50}$  du virus d'épreuve utilisée dans le test de ce vaccin est de 100, il est par conséquent classé comme un vaccin fort. Autre exemple, le S.86, possède une  $VA$  de 0,98, il peut paraître comme un vaccin fort mais la  $DL_{50}$  du virus d'épreuve est de 6, c'est donc un vaccin faible.

Pour le test d'IDR, nous avons fixé un barème de classification sur lequel nous nous sommes basés pour classer les vaccins selon leurs valeurs antigéniques ( $VA$ ). Un vaccin est classé :

- **Forts** : si la  $VA$  obtenue est  $> 0,8$
- **Moyens** : si la  $VA$  obtenue est comprise entre  $0,6 < VA < 0,8$
- **Faibles** : si la  $VA$  obtenue est  $< 0,6$

#### **4.5. Traitement des données**

Pour le traitement des données, nous nous sommes appuyés sur le calcul des droites de régressions afin de déterminer les coefficients de corrélations. En fonction de la loi normale, les tests d'hypothèses paramétriques et non paramétriques ont été appliqués pour comparer les groupes expérimentaux avec une  $p\text{-value}=0,05$  fixée comme limite de signification. Une analyse multivariée a été appliquée pour visualiser les corrélations entre les  $DL_{50}$  et les  $VA$  dans le test des NIH. Les calculs ont été faits à l'aide du logiciel R (R Development Core Team 2010).

# **Chapitre III**

## **Résultats**

**1. Résultats des tests de précipitations pour la recherche des anticorps spécifiques dans les immuns sérums par la technique d'immunodiffusion double d'Ouchterlony**

**1.1. Résultats du test de précipitation de l'immun sérum antirabique IPA vis-à-vis des virus utilisés**

Le tableau 9 résume l'ensemble des résultats des réactions de précipitation de l'immun sérum antirabique IPA, ces résultats ne montrent la présence d'aucun arc de précipitation entre cet immun sérum et le virus ERA vivant pur, et inactivé pur. Ces deux formes de virus, même avec des dilutions allant jusqu'à 1/32, ne forment pas d'arcs de précipitation. Le virus CVS lui aussi ne forme pas d'arcs de précipitation avec l'immun sérum antirabique IPA même après dilution.

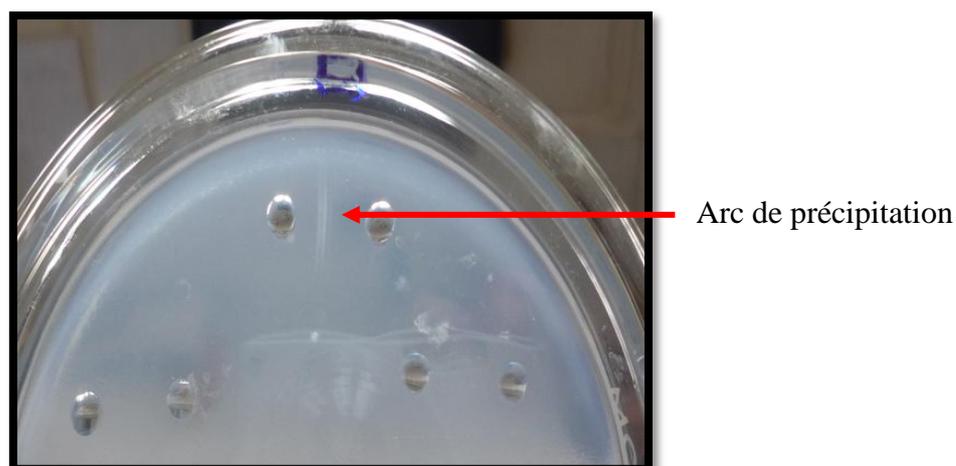
Cependant les résultats montrent la présence d'au moins un arc de précipitation avec le virus LPS vivant et/ou inactivé ainsi qu'avec le mélange ERA/LPS et l'immun sérum antirabique IPA.

**TABLEAU 9 : Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique IPA vis-à-vis des virus utilisés**

Virus rabiques	Résultats
ERA vivant et inactivé pur	-
ERA vivant et inactivé 1/2	-
ERA vivant et inactivé 1/4	-
ERA vivant et inactivé 1/8	-
ERA vivant et inactivé 1/16	-
ERA vivant et inactivé 1/32	-
LPS vivant	+
LPS inactivé	+
ERA/LPS vivant	+
ERA/LPS inactivé	+
CVS vivant pur	-
CVS vivant 1/2	-
CVS vivant 1/4	-
CVS vivant 1/8	-
CVS vivant 1/16	-
CVS vivant 1/32	-

+ : Présence d'un seul arc de précipitation

-- : Absence d'arc de précipitation



**FIGURE 24 : Résultats de la précipitation de l'IS antirabique IPA avec le virus LPS inactivé sans coloration (Photo personnelle)**

## 1.2. Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique Butantan<sup>®</sup> vis-à-vis des virus utilisés

Les résultats présentés par le tableau 10 montrent la présence de plusieurs arcs de précipitation entre l'immun sérum antirabique Butantan<sup>®</sup> et le virus ERA vivant pur et inactivé pur ainsi qu'avec le virus CVS vivant.

Cependant, aucun arc de précipitation n'est perçu avec le virus LPS aussi bien vivant et inactivé pur qu'après dilutions. Quand au mélange ERA/LPS, il entraîne la formation de deux arcs de précipitation avec l'immun sérum antirabique Butantan<sup>®</sup>.

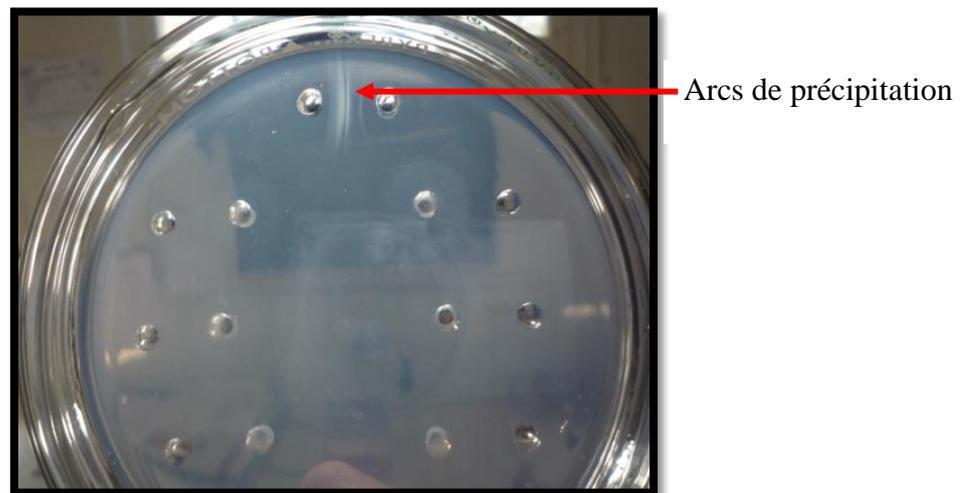
**TABLEAU 10: Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique Butantan<sup>®</sup> vis-à-vis des virus utilisés**

Virus rabiques	Résultats
ERA vivant pur	+*
ERA inactivé pur	+*
LPS vivant et inactivé pur	-
LPS vivant et inactivé 1/2	-
LPS vivant et inactivé 1/4	-
LPS vivant et inactivé 1/8	-
LPS vivant et inactivé 1/16	-
LPS vivant et inactivé 1/32	-
ERA/LPS vivant	+*
ERA/LPS inactivé	+*
CVS vivant	+

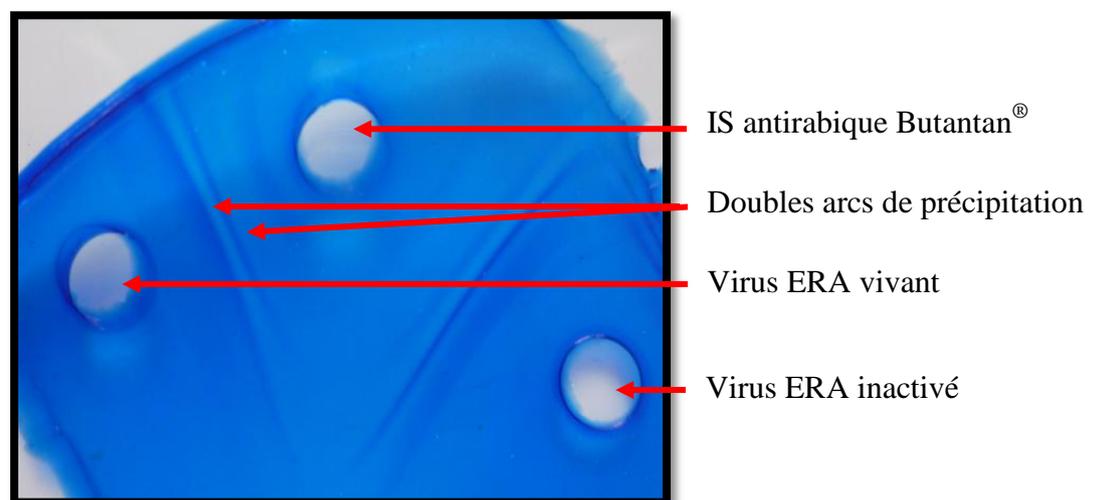
+ : Présence d'un seul arc de précipitation

+\* : Présence d'un double arc de précipitation

-- : Absence d'arc de précipitation



**FIGURE 25 :** Résultats de la précipitation de l'IS antirabique Butantan<sup>®</sup> avec le virus ERA vivant sans coloration (Photo personnelle)



**FIGURE 26 :** Résultats de la précipitation de l'IS antirabique Butantan<sup>®</sup> avec le virus ERA vivant et inactivé après coloration (Photo personnelle)

### 1.3. Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique Vinrab<sup>®</sup> vis-à-vis du virus ERA

L'immun sérum antirabique Vinrab<sup>®</sup> ne montre aucun arc de précipitation ni en présence du virus ERA vivant pur ni même après dilutions.

**TABLEAU 11** : Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique Vinrab<sup>®</sup> vis-à-vis du virus ERA

Virus rabiques	Résultats
ERA vivant pur	–
ERA vivant 1/2	–
ERA vivant 1/4	–
ERA vivant 1/8	–
ERA vivant 1/16	–
ERA vivant 1/32	–

–: Absence d'arc de précipitation

### 1.4. Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique Favirab<sup>®</sup> vis-à-vis du virus ERA

Testé avec la souche rabique ERA pur, cet immun sérum n'a pas formé d'arcs de précipitation.

**TABLEAU 12** : Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique Favirab<sup>®</sup> vis-à-vis du virus ERA

Virus rabiques	Résultats
ERA	–

– : Absence d'arc de précipitation

### 1.5. Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique SII<sup>®</sup> vis-à-vis des virus utilisés

Pour l'immun sérum SII<sup>®</sup>, les arcs de précipitation sont bien visibles que ce soit en présence du virus CVS vivant ou du virus mixte ERA/LPS.

**TABLEAU 13** : Résultats du test de précipitation de l'IS antirabique SII<sup>®</sup> vis-à-vis des virus utilisés

Virus rabiques	Résultats
ERA/LPS	+
CVS	+

+ : Présence d'un seul arc de précipitation

### 1.6. Résultats du test de précipitation de la matière cérébrale des souriceaux témoins

Les résultats de ce test ne montrent aucun arc de précipitation entre la matière cérébrale provenant des souriceaux témoins et les immuns sérums antirabiques IPA et Butantan<sup>®</sup>.

**TABLEAU 14 : Résultats du test de précipitation de la matière cérébrale de souriceaux témoins vis-à-vis des IS antirabiques IPA et Butantan<sup>®</sup>**

Matière cérébrale de souriceaux témoins	IS antirabiques	Résultats
	IPA	–
	Butantan <sup>®</sup>	–

- : Absence d'arc de précipitation

### 1.7. Résultats du test de précipitation des IS des souris hyper immunisées

Les résultats des tests de précipitation des IS des souris hyperimmunisées sont résumés dans le tableau 15.

L'immun sérum anti-LPS des souris hyperimmunisées avec le virus LPS inactivé ne montre aucun arc de précipitation spécifique quelque soit le virus vis-à-vis du quel il a été testé (virus LPS inactivé, virus ERA vivant, mélange ERA/LPS inactivé).

Dans le cas de l'immun sérum anti-ERA des souris hyperimmunisées avec le virus ERA vivant, on voit bien la présence de plusieurs arcs de précipitation en présence du virus ERA vivant et du mélange ERA/LPS, par contre le virus LPS inactivé n'est pas reconnu.

Nous avons observé également des arcs de précipitation pour l'immun sérum anti-ERA/LPS des souris hyperimmunisées avec le virus ERA vivant et le mélange ERA/LPS inactivé, mais par contre aucun arc de précipitation n'est observé avec le virus LPS inactivé.

**TABLEAU 15 : Résultats des tests de précipitation des IS des souris hyperimmunisées**

Virus	Immuns Sérums	Résultats
Virus LPS inactivé	anti-LPS	–
	anti-ERA	–
	anti-ERA/LPS	–
Virus ERA vivant	anti-LPS	–
	anti-ERA	+*
	anti-ERA/LPS	+*
Mélanges ERA/LPS inactivé	anti-LPS	–
	anti-ERA	+
	anti-ERA/LPS	+

+ : Présence d'un seul arc de précipitation

+\* : Présence d'un double arc de précipitation

- : Absence d'arc de précipitation

Cette première étape des tests d'Ouchterlony nous a permis de déterminer la présence d'anticorps dans les différents immuns sérums qui réagissent avec les souches rabiques dans un milieu gélifié.

A l'issue de ces résultats nous avons fait un screening, ne gardant maintenant pour la suite que le ou les immuns sérums ayant réagi avec le virus LPS, souche utilisée pour la production du vaccin antirabique tissulaire à usage humain. Au vue des résultats obtenus nous avons opté pour l'utilisation de l'immun sérum antirabique produit à l'IPA (lot: 50512).

## **2. Résultats des tests de précipitation utilisés dans la détermination de la VA des vaccins par la technique d'immunodiffusion radiale de Mancini**

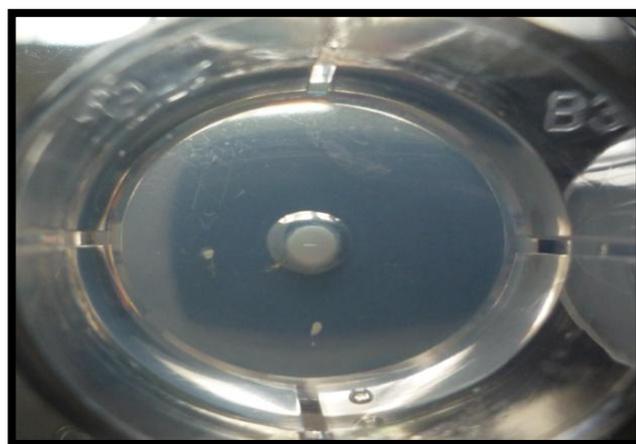
### **2.1. Résultats des tests nécessaires à la détermination de la quantité d'IS antirabique IPA à incorporer dans la gélose à 1%**

L'incorporation de différentes quantités d'IS antirabique IPA allant de 15 jusqu'à 500 µl/cupule dans la gélose à 1% (taux de protéine allant de 0,16 à 500 µg/ml) ne montre aucun anneau de précipitation (Figure 27).

**TABLEAU 16 : Résultats des différents volumes d'IS antirabique IPA incorporés dans la gélose à 1%**

Numéro de cupules	Volume de gélose à 1% (ml)	Volume d'IS antirabique (µl)	Taux de protéines (µg/ml)	Observation	Résultats
1	2,8	15	0,16	<b>Bonne solidification de la gélose</b>	-
2	2,8	20	0,21		-
3	2,8	30	0,32		-
4	2,8	40	0,43		-
5	2,8	50	0,53		-
6	2,7	100	1,10		-
7	2,65	150	1,65		-
8	2,60	200	2,20		-
9	2,55	250	2,75		-
10	2,5	300	3,30		-
11	2,45	350	3,85		-
12	2,4	400	4,40		-
13	2,35	450	4,95	<b>Pas de solidification de la gélose</b>	-
14	2,3	500	5,50		-

- : Absence d'anneaux de précipitation



**FIGURE 27 : Aspect d'un résultat négatif (Photo personnelle)**

Nous avons également remarqué que pour les valeurs de 450 et 500 µl d'IS antirabique la gélose ne se solidifie pas assez, du coup, la réalisation des puits devient impossible dans cet état semi liquide. C'est ce qui nous a conduit à augmenter la concentration de la gélose à 2%.

**2.2.Résultats des tests nécessaires à la détermination de la quantité d'IS antirabique IPA à incorporer dans la gélose à 2%**

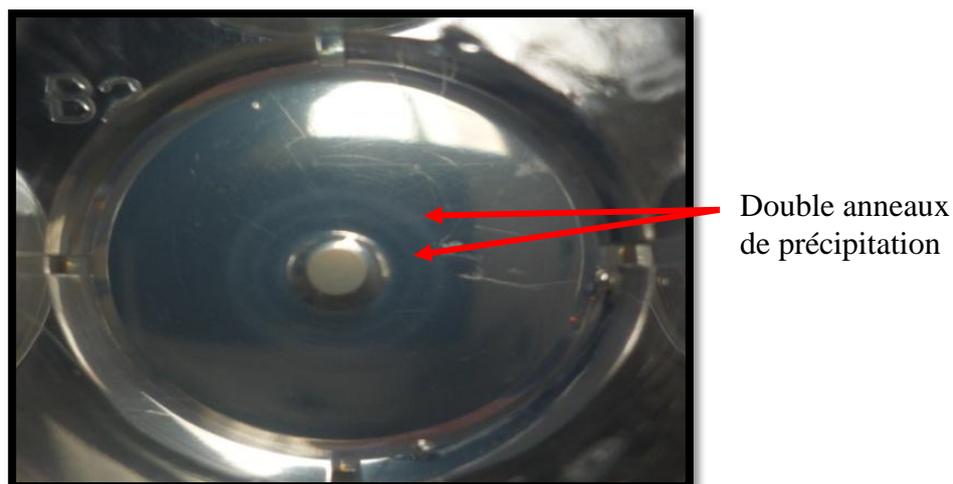
Nous avons augmenté la concentration de la gélose à 2% et utilisé des volumes plus importants d'immun sérum antirabique IPA dans le but d'avoir un taux d'anticorps plus important dans la gélose et permettre ainsi l'apparition d'anneaux de précipitation.

Nous avons remarqué que l'incorporation de 500 jusqu'à 1300 µl d'IS antirabique IPA dans la gélose (soit un taux de protéines incorporées allant de 5,50 à 14,30 µg/ml) ne montre la présence d'aucun anneau de précipitation. Mais avec un volume de 1400 µl d'IS antirabique IPA incorporé soit un taux de protéines de 15,40 µg/ml, nous remarquons la présence d'un double anneau de précipitation (Figure 28).

**TABLEAU 17 : Résultats des différents volumes d'IS antirabique IPA incorporés dans la gélose à 2%**

Numéro de cupules	Volume de gélose à 2% (ml)	Volume d'IS antirabique (µl)	Taux de protéines (µg/ml)	Observations	Résultats
1	2,3	500	5,50	<b>Bonne solidification de la gélose</b>	-
2	2,2	600	6,60		-
3	2,1	700	7,70		-
4	2	800	8,80		-
5	1,9	900	9,90		-
6	1,8	1000	11,00		-
7	1,7	1100	12,10		-
8	1,6	1200	13,20		-
9	1,5	1300	14,30		-
<b>10</b>	<b>1,4</b>	<b>1400</b>	<b>15,40</b>		

+ : Présence d'anneaux de précipitation  
 - : Absence d'anneaux de précipitation



**FIGURE 28** : Aspect d'un résultat positif - Double anneaux de précipitation  
(Photo personnelle)

Nous avons fait le choix de nous arrêter à la quantité maximale de **1400 µl** d'IS antirabique IPA car cela permet d'avoir à la fois une concentration finale de gélose à 1% et une quantité suffisante d'Ac (taux de protéines : **15,40µg/ml**) dans la cupule pour permettre la formation d'anneaux de précipitation.

### 2.3. Résultats du test IDR du virus LPS inactivé

Les résultats présentés dans le tableau 18 montrent que l'introduction du virus LPS inactivé pur dans le puits entraîne la formation d'anneaux de précipitation dont le diamètre diminue lorsque la dilution du virus augmente jusqu'à devenir pratiquement invisible ou carrément s'annuler pour des dilutions supérieures au 1/8.

**TABLEAU 18** : Diamètres des anneaux de précipitation formés par le virus LPS inactivé

Dilutions du virus LPS inactivé	Diamètres des anneaux de précipitation (mm)
Pur	13
1/2	11
1/4	9
1/8	0
1/16	0
1/32	0

**2.4. Résultats du test IDR de deux lots de vaccins antirabiques tissulaires inactivés**

Le tableau 19 regroupe les résultats des vaccins S.135 et S.119, nous constatons que ces vaccins classés comme forts selon le test des NIH (avec des VA respectives de 0,98 et 0,61 contre 31DL<sub>50</sub> pour le vaccin S.135 et 100DL<sub>50</sub> pour le S.119), forment des anneaux de précipitation avec des diamètres de 14 mm lorsqu'ils sont testés à l'état pur.

Mais dès que l'on procède à des dilutions, la différence entre les deux vaccins devient visible, notamment à partir d'une dilution au huitième, en effet, le vaccin S.135 ne forme plus d'anneau de précipitation visible à l'œil nu, alors que le vaccin S.119 forme un anneau de 7 mm de diamètre. Pour les dilutions encore plus élevées (1/16 et 1/32), il ne se forme plus d'anneaux de précipitation visibles pour les deux vaccins.

**TABLEAU 19 : Diamètres des anneaux de précipitation formés par les vaccins S.135 et S.119**

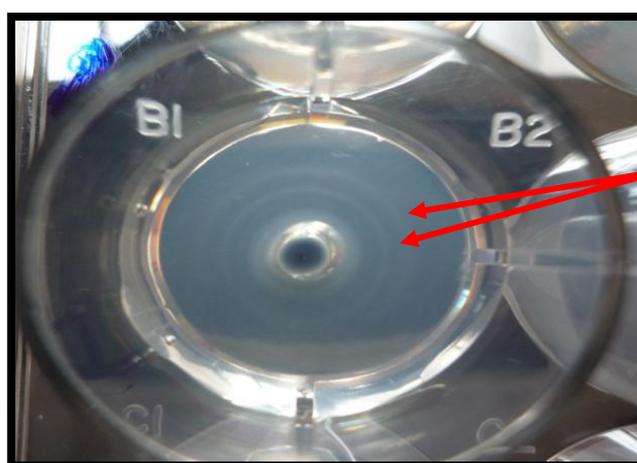
Dilutions des vaccins	Diamètres des anneaux de précipitation (mm)	
	S.135	S.119
Pur	14	14
1/2	10	11
1/4	8	9
1/8	0	7
1/16	0	0
1/32	0	0

**2.5. Résultats du test IDR du vaccin de référence**

Les résultats du vaccin de référence S.122 sont regroupés dans le tableau 20, ce vaccin entraîne la formation d'anneaux de précipitation de diamètres plus importants comparativement aux deux autres vaccins, c'est ainsi que testé pur il présente un anneau de précipitation avec un diamètre de 17 mm, au fur à mesure que l'on procède aux dilutions ce diamètre diminue et s'annule à la dilution de 1/32 (Figure 29).

**TABLEAU 20 : Diamètres des anneaux de précipitation formés par le vaccin de référence S.122**

Dilutions du vaccin de référence S.122	Diamètres des anneaux de précipitation (mm)
Pur	17
1/2	14
1/4	12
1/8	11
1/16	7
1/32	0



Double anneaux de précipitation concentriques

**FIGURE 29: Résultats de la précipitation du vaccin de référence S.122 après reconstitution de 4 flacons de vaccins (Photo personnelle)**

## 2.6. Etablissement de la courbe d'étalonnage

Les paramètres du vaccin de référence S.122 après reconstitution de 4 flacons retenus pour tracer la courbe d'étalonnage sont regroupés dans le tableau 21.

Pour chaque dilution, le diamètre au carré de l'anneau de précipitation correspondant est proportionnel à la VA du vaccin S.122, c'est ainsi que :

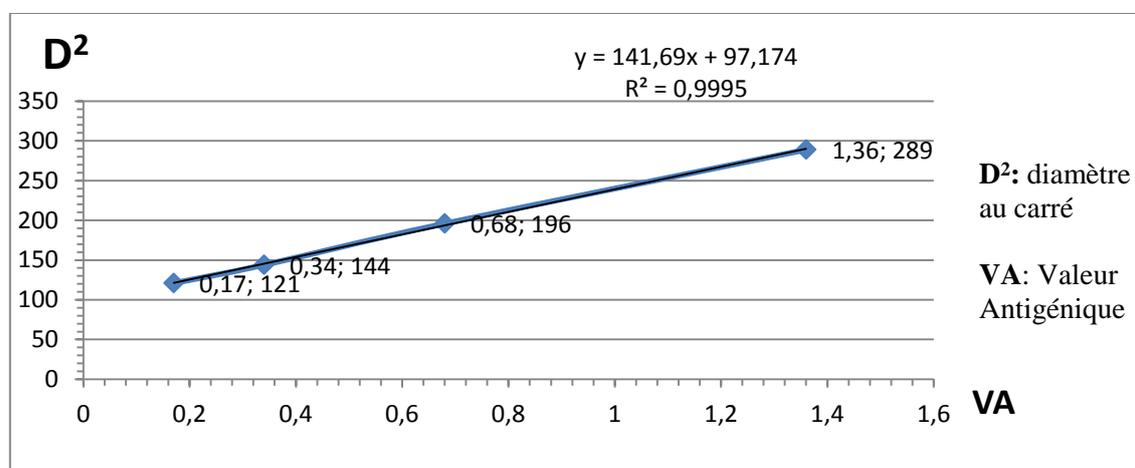
- Le diamètre au carré de l'anneau de précipitation du vaccin **S.122 pur** peut être assimilé à sa valeur antigénique soit **1,36**.
- Le diamètre au carré de l'anneau de précipitation du vaccin **S.122 dilué au 1/2** peut être assimilé à  $1,36/2$  soit **0,68**.

- Le diamètre au carré de l'anneau de précipitation du vaccin S.122 dilué au 1/4 peut être assimilé à  $1,36/4$  soit **0,34**.
- Le diamètre au carré de l'anneau de précipitation du vaccin S.122 dilué au 1/8 peut être assimilé à  $1,36/8$  soit **0,17**.

**TABLEAU 21: Paramètres du vaccin de référence S.122 retenus pour tracer la courbe d'étalonnage**

Dilutions vaccin S.122	Diamètres des anneaux de précipitation (mm)	Diamètres au carré	Valeurs Antigéniques correspondantes
Pur	17	289	1,36
1/2	14	196	0,68
1/4	12	144	0,34
1/8	11	121	0,17

En utilisant ces résultats nous avons tracé une courbe d'étalonnage de la valeur antigénique du vaccin S.122 en fonction du diamètre au carré de l'anneau de précipitation correspondant à chaque dilution du vaccin. La courbe obtenue est représentée dans la Figure 30.



**FIGURE 30: Courbe d'étalonnage du vaccin de référence S.122 après reconstitution de 4 flacons**

## 2.7. Résultats des tests IDR d'un groupe de vaccins

Les résultats regroupés dans le tableau 22 montrent que les diamètres des anneaux de précipitation formés par les 12 vaccins testés purs sont identiques. Avec les dilutions, quelques différences apparaissent mais les diamètres restent assez proches.

**TABLEAU 22: Diamètres des anneaux de précipitation formés par les vaccins testés**

Vaccins testés		Diamètres des anneaux de précipitation (mm) en fonction des dilutions			
		Pur	1/2	1/4	1/8
Forts	S.138	14	11	8	0
	S.72	14	11	8	0
	S.119	14	11	9	7
	S.135	14	10	8	0
Moyens	S.76	14	10	8	0
	S.90	14	11	8	0
	S.115	14	11	7	0
	S.133	14	11	8	0
Faibles	S.87	14	11	8	0
	S.111	14	10	8	0
	S.81	14	11	8	0
	S.144	14	11	7	0

En reportant le diamètre au carré de chaque vaccin pur sur la courbe d'étalonnage nous obtenons la même valeur antigénique pour tous les vaccins soit **0,69**.

L'absence de différence entre les vaccins forts, moyens et faibles après reconstitution de 4 flacons de vaccins nous a amené à utiliser une nouvelle technique d'approche lors de la reconstitution des vaccins, ainsi nous avons fait des tests avec 3 flacons puis 2 flacons et enfin 1 flacon de vaccins reconstitués dans 1ml de PBS.

### 2.8. Résultats des tests IDR avec un, deux et trois flacons de vaccins reconstitués

A travers les résultats présentés dans le tableau 23 nous remarquons que même avec 3 flacons de vaccins reconstitués les résultats sont presque identiques quand on opère sans dilution, par contre avec les dilutions nous observons quelques différences, ceci est probablement dû au fait que la concentration d'antigènes vaccinaux dans les puits devient de plus en plus faible. Là aussi la différenciation entre les vaccins n'est pas évidente.

Avec 1 flacon de vaccin reconstitué, les résultats concernant les vaccins faibles ne semblent pas intéressants, les anneaux de précipitation sont trop près des puits ce qui rend la mesure des diamètres avec un pied à coulisse très difficile et le risque d'erreur plus important.

Avec 2 flacons de vaccins, les diamètres des anneaux de précipitation sont différents selon la catégorie du vaccin (fort, moyen ou faible), de plus ils sont proportionnels à la dilution du vaccin.

**TABLEAU 23 : Diamètres des anneaux de précipitation formés par les vaccins après reconstitution de un, deux et trois flacons de vaccins**

Vaccins	Nombre de flacons vaccins reconstitués	Diamètres des anneaux de précipitation (mm) en fonction des dilutions			
		Pur	1/2	1/4	1/8
S.72	3	13	11	7	0
	2	12	8	0	0
	1	9	6	0	0
S.90	3	13	10	6	0
	2	11	8	0	0
	1	8	6	0	0
S.81	3	13	10	0	0
	2	10	7	0	0
	1	7	0	0	0
S.122	<b>3</b>	<b>16</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>7</b>
	<b>2</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>5</b>
	<b>1</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>0</b>

Notre choix à donc porté sur l'utilisation de **2 flacons** de vaccins reconstitués avec 1ml de PBS pour tester tous les vaccins qui restent à analyser.

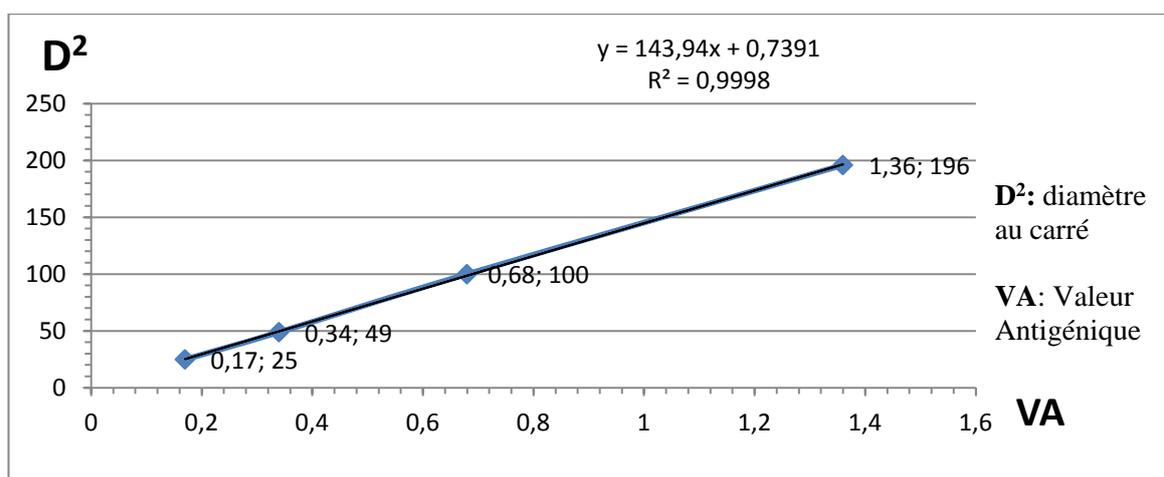
### **2.9. Etablissement de la nouvelle courbe d'étalonnage**

Nous avons tracé une nouvelle courbe d'étalonnage avec les résultats du vaccin de référence S.122 obtenus après reconstitution de 2 flacons de vaccins dans 1 ml de PBS. Les paramètres retenus pour tracer la courbe sont présentés dans le tableau 24.

**TABLEAU 24:** Paramètres du vaccin de référence S.122 après reconstitution de 2 flacons retenus pour tracer la courbe d'étalonnage définitive

Dilutions vaccin S.122	Diamètres des anneaux de précipitation (mm)	Diamètres au carré	Valeurs Antigéniques correspondantes
Pur	14	196	1,36
1/2	10	100	0,68
1/4	7	49	0,34
1/8	5	25	0,17

En utilisant ces nouveaux paramètres, nous avons tracé la nouvelle courbe d'étalonnage de la valeur antigénique du vaccin de référence S.122 en fonction du diamètre au carré des anneaux de précipitation correspondant aux dilutions du vaccin.



**FIGURE 31:** Courbe d'étalonnage du vaccin de référence S.122 après reconstitution de 2 flacons

Cette nouvelle courbe d'étalonnage retenue va servir à déterminer la valeur antigénique de tous les vaccins antirabiques qui seront testés dans la suite du travail.

## 2.10. Résultats des tests IDR des différents vaccins antirabiques tissulaires inactivés

Les résultats du vaccin de référence S.122 testé dans les 4 premières cupules de chaque boîte sont les mêmes quelque soit le test et sont identiques à ceux utilisés pour tracer la courbe d'étalonnage (cf Tableau 24). Les résultats des autres vaccins sont regroupés dans les tableaux donnés en annexe 11.

**2.11. Résultats des tests IDR d'un groupe de vaccins avant contrôle par le test des NIH**

Les diamètres des anneaux de précipitations formés par les 6 vaccins ainsi que les valeurs antigéniques correspondantes sont regroupés dans le tableau 25.

**TABLEAU 25 : Diamètres des anneaux de précipitations et valeurs antigéniques des vaccins testés avant contrôle par le test des NIH**

<b>Cupules</b>	<b>Vaccins antirabiques</b>	<b>Diamètres des anneaux de précipitation (mm)</b>	<b>Valeurs antigéniques correspondantes</b>
A1	S.122 Pur	14	<b>1,36</b>
A2	S.122 au 1/2	10	<b>0,68</b>
A3	S.122 au 1/4	7	<b>0,34</b>
A4	S.122 au 1/8	5	<b>0,17</b>
B1	S.149	11	<b>0,84</b>
B2	S.150	10	<b>0,69</b>
B3	S.151	10	<b>0,69</b>
B4	S.152	10	<b>0,69</b>
C1	S.153	10	<b>0,69</b>
C2	S.154	11	<b>0,84</b>

Après lecture des résultats du test des NIH, Nous constatons que sur les 6 vaccins testés, 4 d'entre eux concordent avec les résultats de l'IDR.

**3. Résultats des tests des NIH**

Les résultats de tous les lots de vaccins antirabiques testés par le test des NIH sont regroupés dans les tableaux donnés en annexe 12.

**4. Analyse des résultats et traitement des données**

**4.1. Classification des vaccins**

Sur la base des tests des NIH et de l'IDR, les vaccins ont été classés en trois catégories: forts, moyens et faibles. Le nombre de vaccins qui découle de cette classification est porté sur le tableau 26 (les détails sont donnés en annexes 12 et 13).

**TABLEAU 26 : Nombre et pourcentage de vaccins classés par catégories selon le test des NIH et IDR**

Classement des vaccins	NIH		IDR	
	Nombre de vaccins	Pourcentage (%)	Nombre de vaccins	Pourcentage (%)
Vaccins forts	22	29	34	44
Vaccins moyens	40	52	32	42
Vaccins faibles	15	19	11	14
Total	77	100	77	100

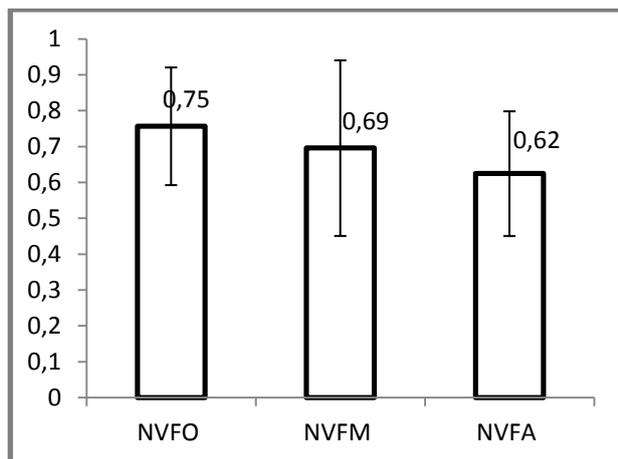
La classification des vaccins selon les résultats de l’IDR a donné 44% de vaccins forts, 42% de vaccins moyens et 14% de vaccins faibles. À partir des résultats du test des NIH, la classification a donné 29% de vaccins forts, 52% de vaccins moyens et 19% de vaccins faibles.

#### 4.2. Variabilité et profils des vaccins dans le test des NIH

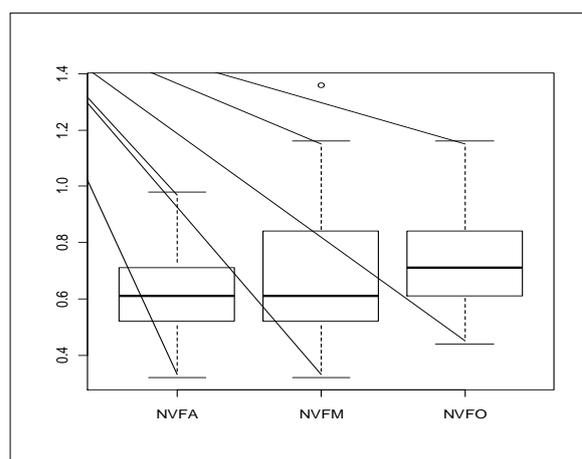
##### 4.2.1. Variabilité et comparaison des VA des vaccins dans le test des NIH

Le calcul des moyennes des VA (Figure 32a), fait ressortir un rapprochement des trois catégories de vaccins, ceci est également validé par le test non paramétré étant donné que les trois catégories de vaccins (forts, moyens et faibles) ne montrent aucune différence significative (Kruskal.test, **p.value = 0,1087**).

Le profil des trois catégories mis en évidence par la variabilité des VA (Figure 32b), fait ressortir une donnée incohérente qui met en cause les vaccins **S.145 ; S.146 ; S.0.74** et **S.0.73** du lot moyen ; Ceci nous laisse supposer que les VA de ces derniers ont une influence sur le profil unique de ces trois catégories puisque les vaccins moyens sont non conformes à la loi gaussienne (Shapiro -W.test ; **p.value = 0,023**) contrairement aux vaccins faibles et forts (respectivement, Shapiro-W.test ; **p.value = 0,67 ; 0,31**).



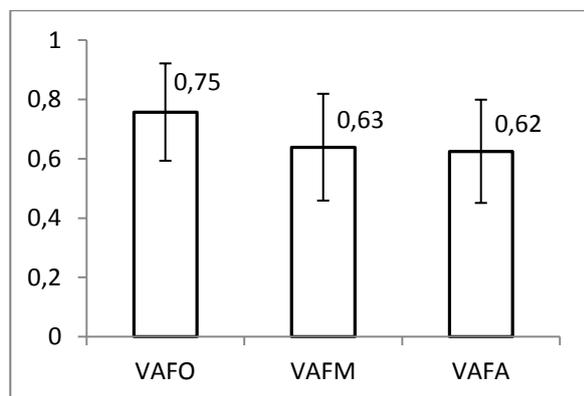
**FIGURE 32a :** Moyenne et écart type des VA des trois catégories de vaccins dans le test des NIH



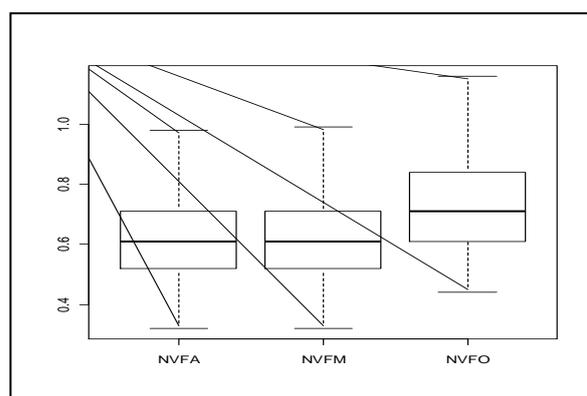
**FIGURE 32b :** Variabilité des VA des trois catégories de vaccins dans le test des NIH

NVFO : Vaccin Fort selon le NIH ; NVFM : Vaccin Moyen selon le NIH ; NVFA : Vaccin Faible selon le NIH

La déclassification des quatre vaccins du lot moyen a permis de modéliser et confirmer le profil original des trois catégories de vaccins dans le test des NIH (Figure 33a et 33b) entre lesquels une différence significative est relevée (ANOVA, **p.value = 0,026**).



**FIGURE 33a :** Moyenne et écart type des VA des trois catégories de vaccins reconfigurés dans le test des NIH



**FIGURE 33b :** Variabilité des VA des trois catégories de vaccins reconfigurés dans le test des NIH

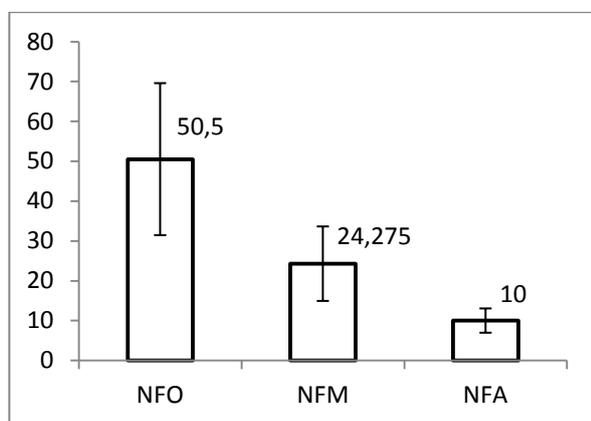
A travers les résultats issus de la comparaison par paire, le test de Newman et keuls a fait ressortir deux groupes homogènes A et B. Il existe une différence significative entre le groupe A, qui représente les vaccins forts et le groupe B qui représente les vaccins moyens et faibles. Cependant aucune différence significative n'est décelée entre les vaccins du groupe B (Tableau 27 dont les détails sont donnés en annexe 14).

**TABLEAU 27 : Comparaison des vaccins dans le test des NIH par le test de Newman-Keuls avec un intervalle de confiance de 95%**

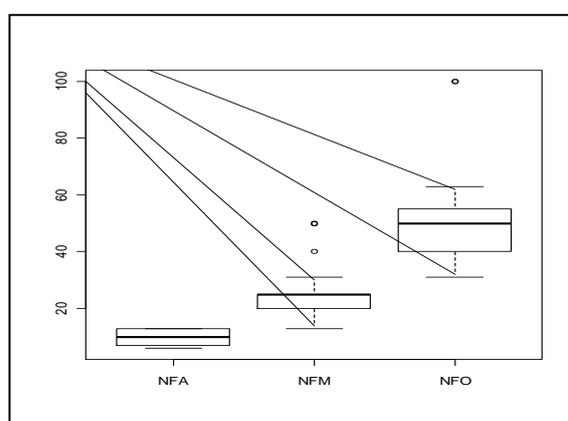
Modalité	Moyenne estimée	Groupes	
<b>NIHFO</b>	0,757	<b>A</b>	
<b>NIHM</b>	0,639		<b>B</b>
<b>NIHFA</b>	0,625		<b>B</b>

#### 4.2.2. Variabilité et comparaison des DL<sub>50</sub> des vaccins dans le test des NIH

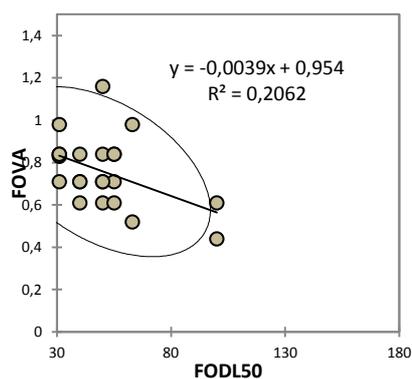
Les résultats de la variabilité des DL<sub>50</sub> et de la moyenne des trois catégories de vaccins dans le test des NIH (Figure 34a, 34b) montrent une différence hautement significative (Kruskal.test : **p.value = 5,72 10<sup>-13</sup>**). Les DL<sub>50</sub> des vaccins forts sont les plus élevés des trois catégories de vaccins et celles des vaccins faibles sont les plus basses. Cette différence, qui apparait entre ces trois catégories de vaccins dans le test des NIH est maintenue même avec la nouvelle configuration des vaccins moyens, puisque les DL<sub>50</sub> des vaccins déclassés (S.145 ; S.146 ; S.74 ; S.73) n'influencent en aucun cas cette variabilité et que les données incohérentes présentes (Figure 35b) sont relatives à l'absence de corrélation (Figure 35a, 35b, 35c ; **0,206 < R<sup>2</sup> < 0,256**) entre les DL<sub>50</sub> de chaque catégorie de vaccins.



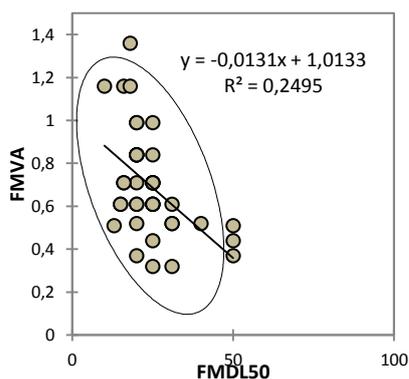
**FIGURE 34 a : Moyenne avec écart type des DL<sub>50</sub> des trois catégories de vaccins dans le test des NIH**



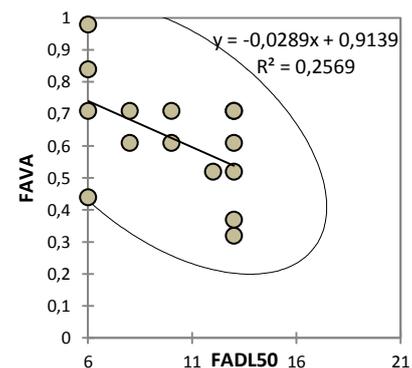
**FIGURE 34 b : Variabilité des DL<sub>50</sub> des trois catégories de vaccins dans le test des NIH**



**FIGURE 35a :** Corrélation entre les DL<sub>50</sub> des vaccins forts



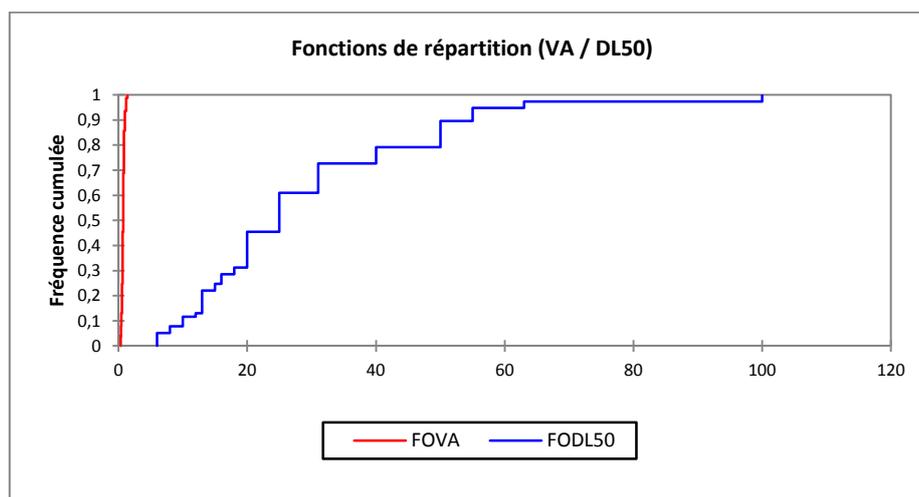
**FIGURE 35b:** Corrélation entre les DL<sub>50</sub> des vaccins moyens



**FIGURE 35c :** Corrélation entre les DL<sub>50</sub> des vaccins faibles

### 4.2.3. Répartition et dépendance entre VA et DL<sub>50</sub> des vaccins dans le test des NIH

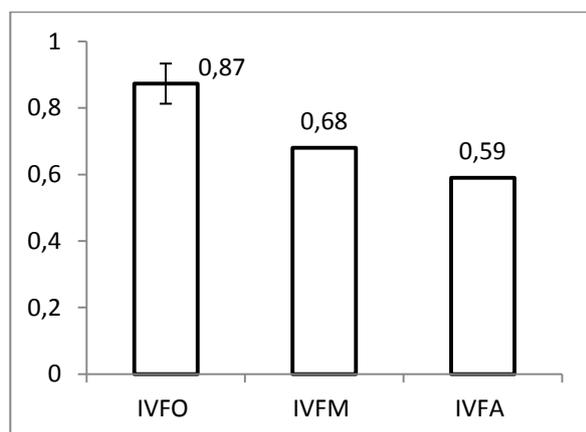
Les DL<sub>50</sub> augmentent avec les VA des trois catégories de vaccins, c'est ce qui ressort des résultats de la tendance des répartitions cumulées de ces derniers (Figure 36). Effectivement, dans la majorité des cas où la VA a été trouvée élevée, elle correspondait à une DL<sub>50</sub> élevée, c'est une forte coïncidence qui ne peut être qu'en faveur d'un bon pouvoir antigénique de ces vaccins. Toutefois, il est à noter qu'il existe une indépendance (KHI<sup>2</sup> : **p.value=1**) et une dispersion entre la tendance de répartition de ces deux paramètres (Kolmogorov-Smirnov test : **p < 0,0001**).



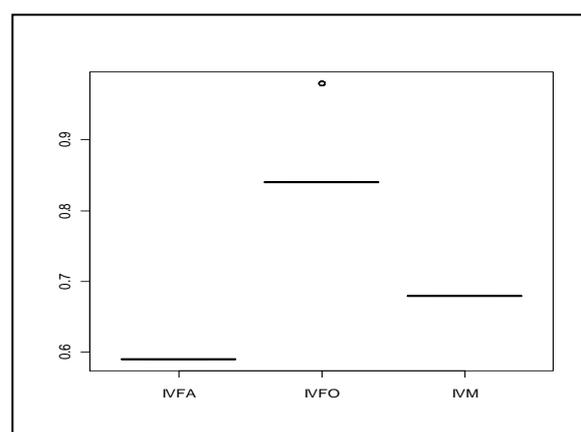
**FIGURE 36:** Tendance des répartitions des VA et des DL<sub>50</sub> des trois catégories de vaccins dans le test des NIH

### 4.3. Variabilité et profils des vaccins dans le test d'IDR

Les valeurs des VA font ressortir clairement les trois catégories de vaccins et montrent une différence hautement significative (Kruskal.test :  $p.value = 2,305 \cdot 10^{-16}$ ). Néanmoins, il n'existe aucune variabilité des VA dans ces catégories de vaccins (Figure 37a, 37b), en raison de leurs constances, excepté pour les vaccins forts générant une deuxième VA moins fréquente mais plus élevée (Figure 37a, 37b).



**FIGURE 37a :** Moyennes avec écart type des VA des trois catégories de vaccins dans le test d'IDR



**FIGURE 37b :** Variabilité des VA des trois catégories de vaccins dans le test d'IDR

(IVFO: VA des vaccins forts ; IVFM: VA des vaccins moyens ; IVFA: VA des vaccins faibles)

Le profil (fort, moyen et faible) des vaccins dans le test de l'IDR est confirmé par l'apparition de trois groupes homogènes A, B et C (Tableau 28) et par le test de comparaison par paire de la méthode d'Holm (Tableau 29).

**TABLEAU 28 :** Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Dunnet / Test bilatéral

Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Groupes		
				A	B	C
<b>IDR   IVFA</b>	11	66,000	6,000	<b>A</b>		
<b>IDR   IVM</b>	32	880,000	27,500		<b>B</b>	
<b>IDR   IVFO</b>	34	2057,000	60,500			<b>C</b>

**TABLEAU 29 : Comparaison des vaccins dans le test d'IDR par la méthode d'Holm**

Catégories de vaccins	IVFA	I VFO
IVFO	$2.8 \cdot 10^{-08}$	-
IVM	$2.1 \cdot 10^{-10}$	$4.6 \cdot 10^{-14}$

#### 4.4. Comparaison des résultats des deux tests NIH et IDR

La comparaison des vaccins entre les deux tests (NIH-IDR) « par paire » par la méthode d'Holm (Tableau 30 ; Figure 38a et 38b) (cf annexe 15) fait ressortir qu'il n'existe aucune différence significative (**p > 0,05**) entre les vaccins :

- [NVFA (NIH faible) et IVFA (IRD faible)] ;
- [NVFA (NIH faible) et IVM (IRD moyen)] ;
- [NVFA (NIH faible) et NVFO (NIH fort)] ;
- [NVM (NIH moyen) et IVFA (IDR faible)] ;
- [NVM (NIH moyen) et IVM (IDR moyen)] ;
- [NVM (NIH moyen) et NVFA (NIH faible)] ;
- [NVM (NIH moyen) et IVFO (IDR fort)].

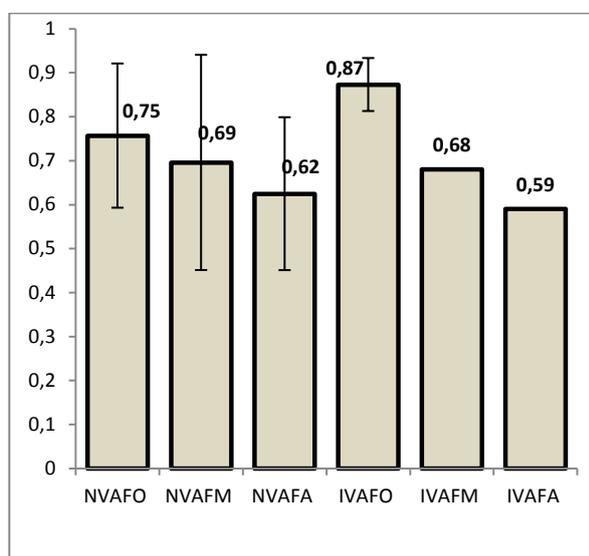
Toutefois, il existe une différence significative (**p < 0,05**) entre les vaccins :

- [IVFA (IRD faible) et IVFO (IRD fort)] ;
- [IVM (IRD moyen) et IVFA (IRD faible)] ;
- [IVFO (IRD fort) et IVM (IRD moyen)] ;
- [IVFO (IRD fort) et NVFA (NIH faible)] ;
- [IVFA (IRD faible) et NVFO (NIH fort)] ;
- [NVFO (NIH fort) et IVFO (IRD fort)] ;
- [IVM (IRD moyen) et NVFO (NIH fort)] ;
- [NVM (NIH moyen) et IVFO (IRD fort)].

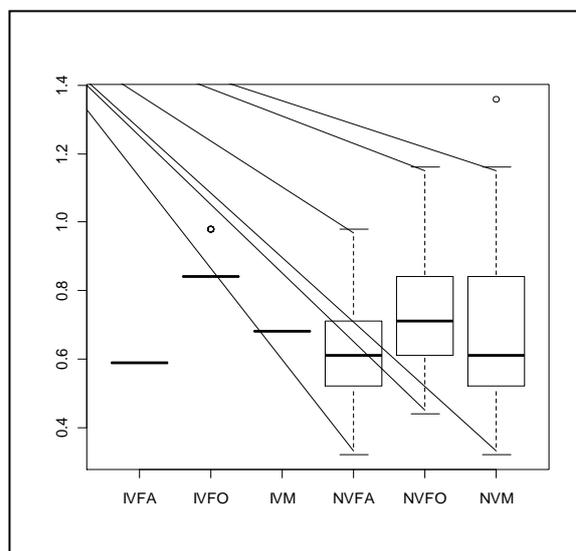
**TABLEAU 30 : Comparaison des résultats des techniques NIH et IDR par paire selon la méthode d'Holm**

Catégories de vaccins	IVFA	IVFO	IVM	NVFA	NVFO
IVFO	$3,7 \cdot 10^{-7}$	-	-	-	-
IVM	$1,4 \cdot 10^{-9}$	$2,3 \cdot 10^{-13}$	-	-	-
NVFA	0,64292	$5,3 \cdot 10^{-6}$	1,00000	-	-
NVFO	0,00113	0,00150	0,01257	0,22234	-
NVM	0,25780	0,00023	1,00000	1,00000	0,6429

IVFA : vaccins faibles par IDR    IVFO : vaccins forts par IDR    IDVM : vaccins moyens par IDR  
 NVFA : vaccins faibles par NIH    NVFO : vaccins forts par NIH    NVM : vaccins moyens par NIH



**FIGURE 38a : Moyennes avec écart types des VA par NIH et IDR**



**FIGURE 38b : Variabilité des VA par NIH et IDR**

# **Chapitre IV**

## **Discussion**

Les techniques utilisées pour le contrôle de l'activité des vaccins antirabiques produits, qu'ils soient à usage humain ou vétérinaire, sont réalisables *in-vivo* et consistent à vacciner des souris puis à les mettre en contact avec un virus vivant (virus d'épreuve). Ces techniques présentent des inconvénients, ce qui a poussé les laboratoires de recherche à mettre en place des techniques *in-vitro* pour contrôler l'activité des vaccins, parmi elles, la technique d'immunodiffusion radiale qui est utilisée pour le contrôle de l'activité des vaccins antirabiques cellulaires.

Dans notre travail nous avons appliqué cette technique pour le contrôle de l'activité des vaccins antirabiques tissulaires. Très peu d'études voir aucune, à notre connaissance, n'ont été publiées concernant l'application de l'IDR aux vaccins antirabiques tissulaires, c'est pourquoi, dans la discussion de nos résultats nous nous référons essentiellement aux travaux réalisés sur des vaccins antirabiques inactivés cellulaires.

L'utilisation de la technique d'immunodiffusion double d'Ouchterlony pour la recherche des anticorps spécifiques dans les immuns sérums antirabiques nous a permis de faire un screening des immuns sérums et des virus à utiliser dans la technique d'immunodiffusion radiale de Mancini. Nous avons ainsi appliqué la technique de précipitation d'Ouchterlony à cinq immuns sérums antirabiques purifiés (immun sérum antirabique IPA, Butantan<sup>®</sup>, Vinrab<sup>®</sup>, Favirab<sup>®</sup> et SII<sup>®</sup>) mis en présence de quatre virus (CVS, ERA, LPS et le mélange ERA/LPS). L'ensemble des résultats obtenus nous a conduit à sélectionner l'immun sérum antirabique IPA pour l'utiliser dans la technique d'immunodiffusion radiale.

Le test de précipitation mené avec l'immun sérum antirabique Butantan<sup>®</sup> et le virus ERA a toujours donné un résultat positif (formation d'un double arc de précipitation au bout de 24 heures), nous avons donc fait le choix de le prendre comme témoin positif. Ainsi, à chaque test, un doublet pour l'immun sérum Butantan<sup>®</sup>/virus ERA est fait en haut de chaque boîte comme témoin positif précoce pour s'assurer que tous les autres paramètres sont correctes.

Concernant les immuns sérums Favirab<sup>®</sup>, Vinrab<sup>®</sup> et SII<sup>®</sup>, ces derniers n'ont pas pu être testés vis-à-vis de toutes les souches virales en raison de la faible quantité d'immun sérum dont nous disposions au niveau du laboratoire.

Pour tous ces tests de précipitation nous avons utilisé des réservoirs de 4 mm de diamètre distants les uns des autres de 1 cm ; selon les expériences de Villemot et Provost

(1958), des lignes de précipitation sont observées plus facilement et plus rapidement si on utilise des réservoirs de 7 mm de diamètre et distants les uns des autres de 7 mm.

Dans les tests d'immunodiffusion radiale, l'immun sérum est incorporé dans la gélose et le vaccin est introduit dans le puits central, la quantité d'anticorps antirabiques dans la gélose ainsi que la concentration d'antigènes vaccinaux présents dans le puits sont très importantes pour la réaction de précipitation. En effet, ces quantités doivent être suffisantes pour atteindre la zone d'équivalence qui permet la formation des anneaux de précipitation.

Plusieurs essais ont été réalisés pour déterminer la quantité optimale d'immun sérum qui permet la formation des anneaux de précipitation, c'est ainsi que différents volumes d'IS antirabique IPA ont été incorporés dans la gélose jusqu'à l'obtention d'un résultat positif. Au delà de 100µl d'immun sérum incorporé, la quantité de gélose est modifiée de façon à avoir un volume final (gélose + immun sérum) de 2,8ml.

Avec 500µl d'IS incorporé (soit un taux de protéine de 5,5 µg/ml), la gélose ne se solidifie pas, ce qui nous a amené à augmenter la concentration de la gélose de 1 à 2% en PBS. De nouvelles quantités d'IS antirabique IPA ont été par la suite incorporées à la gélose de 2% jusqu'à l'apparition d'anneaux de précipitation.

L'immun sérum antirabique IPA qui est incorporé dans l'agarose est le résultat de l'immunisation des chevaux avec la souche LPS qui n'est en réalité que la souche productrice utilisée pour la fabrication du vaccin tissulaire produit localement, c'est ce qui nous a permis d'avoir des résultats fiables car selon Ferguson et Heath (1992) l'utilisation de sérums produits différemment affecte les valeurs obtenues.

Nous avons par la suite procédé à plusieurs tests afin de déterminer le nombre de flacons de vaccins à reconstituer pour permettre la formation d'anneaux de précipitation mesurables et ayant des diamètres proportionnels à la concentration en antigènes vaccinaux présents dans le puits.

Pour cela, le premier test a été fait avec deux vaccins classés forts selon le test des NIH, nous avons fait le choix de reconstituer 4 flacons de chaque vaccin dans 1 ml de tampon PBS afin d'avoir une forte concentration d'antigènes vaccinaux dans les puits.

Par la suite, en conservant les mêmes paramètres, nous avons pris un groupe de vaccins contenant des vaccins faibles, moyens et forts (selon le test des NIH) que nous avons testés pour déterminer leurs valeurs antigéniques

Les résultats obtenus étaient pratiquement tous identiques (diamètre équivalent), ils ne permettaient donc pas de distinguer un vaccin fort d'un vaccin faible ou moyen. Cette absence

de différence entre les trois catégories de vaccins peut être expliquée par le fait que la concentration en antigènes vaccinaux dans le puits est trop importante, par conséquent la zone d'équivalence est atteinte avec les 4 flacons de vaccins faibles reconstitués (mais dont la valeur antigénique est supérieure à 0,3).

C'est ce qui explique la forte probabilité de la formation d'anneaux de même diamètre avec tous les vaccins au vue de la charge en antigènes ramené par les vaccins, c'est également ce qui nous amené à diminuer le nombre de flacons de vaccin à reconstituer à trois puis à deux et enfin à un flacon de vaccin reconstitué à chaque fois avec 1 ml de tampon PBS.

Notre choix à porté sur la reconstitution de deux flacons de vaccins du fait que cette reconstitution permet l'apparition d'anneaux de précipitation proportionnel à la charge d'antigènes vaccinaux dans les puits.

Pour tracer la courbe d'étalonnage nous avons choisi comme vaccin de référence le S.122, qui est un vaccin du même type (tissulaire inactivé) mais sélectionné pour être utilisé comme référence interne au laboratoire dans le test des NIH.

Cette approche est en accord avec les travaux de Ferguson et al en 1987 qui proposent l'utilisation de réactifs spécifiques pour la technique d'IDR. En effet, ces auteurs ont démontré dans leurs travaux que l'utilisation de souches différentes est un élément suffisant pour affecter les valeurs de l'activité des vaccins mesurées par la technique d'IDR si les vaccins de référence et les vaccins testés possèdent des antigènes hétérologues. Selon les mêmes auteurs, ces différences antigéniques entre les souches de virus rabique utilisées pour la production de vaccins peuvent être démontrées en utilisant des anticorps monoclonaux.

La gamme des concentrations utilisées pour tracer la courbe d'étalonnage doit impérativement comprendre des valeurs extrêmes susceptibles d'être retrouvées par le dosage des autres vaccins. C'est pourquoi nous avons utilisé ce vaccin de référence.

Cette approche nous permet également de garder la même référence pour les deux techniques dans l'étude comparative, ce qui est en accord avec les travaux de Sligmann (1973) qui suggère que les corrélations entre les résultats obtenus dans l'épreuve NIH et les tests d'IDR dépendent de la souche de virus utilisée pour la préparation des réactifs de travail dans le test d'IDR. En effet, différentes souches rabiques sont utilisées pour la préparation des vaccins antirabiques partout dans le monde alors que les références internationales pour les tests sont faites avec une seule souche ; la souche Pitman moore (PM) (WHO, 1979, 1983).

Selon Ferguson et Schild (1981), les antigènes utilisés pour le test IDR doivent être traités au préalable par un détergent : le Mulgofen à une concentration de 2% pendant 30 minutes à température ambiante afin de libérer la glycoprotéine de la particule virale. Cette étape n'a pas été réalisée lors de notre expérimentation faute de disponibilité de ce détergent.

Un temps d'incubation de 48 à 72 heures a été nécessaire pour une meilleure visualisation des zones de précipitation, alors que Wood *et al.* (1977) et Ferguson *et al.* (1983) ne recommandent que 24 heures ou un minimum de 18 heures.

Ce long temps d'incubation peut être expliqué dans la technique d'Ouchterlony par le faible diamètre des réservoirs (4mm) et la distance qui les sépare (1cm), en effet selon Villemot et Provost (1958), les arcs de précipitation sont observés plus rapidement lorsque on utilise des réservoirs de 7 mm de diamètre et distants de 7 mm. Dans la technique de Mancini, le dépôt de nouveaux complexes Ag-Ac contribue à l'accentuation des anneaux de précipitation, ce qui rend plus aisé et plus facile la mesure des diamètres de ces anneaux après ce temps de diffusion.

Mancini (1965) a examiné les effets du temps de diffusion, il a démontré qu'il y avait une limite pour les zones de précipitations dépendant de la quantité d'antigènes. L'accroissement des zones de précipitation dépend essentiellement du poids moléculaire, de la température d'incubation et de la densité de l'agarose.

L'outil de mesure des diamètres est important, le plus simple reste le pied à coulisse que nous avons utilisé, des appareils très sophistiqués reliés à un ordinateur permettent une lecture plus précise et plus précoce. Ce sont des appareils intégrés de visualisation et de mesure des anneaux de précipitations. C'est le cas du « transidyne calibration viewer » (Transidyne General Corporation, Ann Arbor, Mich., U.S.A) couplé à un autodata caliper (autodata, hitchin, U.K) (Ferguson et Schild, 1982).

L'analyse de certains paramètres propres à chacune des deux techniques NIH et IDR fait apparaître que dans le cas du test d'IDR, test *in-vitro*, le virus vivant n'intervient pas alors que dans le cas du test des NIH, test *in-vivo*, l'utilisation du virus d'épreuve CVS même calibré ne suffit pas vu que le nombre de  $DL_{50}$  injecté peut varier d'un test à un autre et la dose de virus injectée peut elle aussi varier. C'est pour cette raison que nous avons pris en considération la  $DL_{50}$  et la VA correspondante obtenue en temps réel pour le choix du seuil de classification des vaccins dans le test des NIH. Cet avantage de la technique d'IDR a aussi été cité par Ferguson *et al.* (1984) qui déclarent que les estimations de l'activité des vaccins par le test IDR peuvent être obtenues sans l'utilisation de virus infectieux.

Il faut aussi noter que la micropipette utilisée lors du test IDR est plus précise que la seringue utilisée dans le test des NIH, en effet la qualité de la seringue et le modèle (graduation très dense) impliquent des petites variations dans les doses qui seront injectées par voie intracérébrale, elle-même très difficile à maîtriser. Aussi, la variabilité peut être liée au manipulateur qui travaille longtemps sur un grand nombre d'animaux (risque de perte de vigilance). L'état de l'animal peut modifier les résultats du test des NIH, l'état de santé et la variabilité même très faible du poids des animaux sont à retenir pour des études comparatives.

La technique d'immunodiffusion radiale est rapide, sensible et facile à réaliser, elle nécessite l'utilisation de réactifs de qualité et de stabilité prouvée, mais reste tributaire de l'appareil de lecture qui permet d'avoir une valeur précise grâce à un logiciel de calcul. Cependant le coût de cet appareil reste élevé pour des petits laboratoires, c'est d'ailleurs un des inconvénients de cette technique. Le test des NIH, quant à lui, même s'il nécessite beaucoup de temps reste le test de référence de l'OMS et les valeurs qu'il fournit sont précises.

Après avoir discuté des méthodes et matériels utilisés, nous allons passer dans cette partie à la discussion des résultats.

L'absence d'arcs de précipitation entre certains immuns sérums et virus lors des tests de précipitation pour la recherche des anticorps spécifiques dans les immuns sérums antirabiques (notamment entre l'IS IPA et le virus ERA et CVS, l'IS Butantan<sup>®</sup> et le virus LPS ainsi que les IS Vinrab<sup>®</sup> et Favirab<sup>®</sup> et le virus ERA) est retrouvée dans le travail de Ferguson & Heath (1992), qui mettent en cause le fait que des extra-protéines masquent les arcs de précipitation, ils avancent aussi la possibilité d'un taux faible en particules virales. D'ailleurs le virus ERA que nous avons testé avec l'IS IPA possède un titre plus faible que celui du virus LPS, qui lui donne un résultat positif avec cet immun sérum, c'est ce qui explique l'absence d'arc de précipitation entre le virus ERA et l'IS IPA. Ce même virus ERA donne des arcs avec des IS anti-ERA récolté sur des souris hyperimmunisées avec le virus ERA, ainsi l'étroite spécificité favorise la formation des arcs.

Ces résultats négatifs sont aussi expliqués par les travaux de Grasset et Atanasiu (1961) qui ont constaté que la réaction d'immunoprécipitation ne donne de résultats cohérents que si l'antigène et l'anticorps se trouvent en proportion convenable. Ce qui rejoint les travaux de Thiéry (1960), qui déclare, que si les réponses positives sont sans ambiguïté, les réponses négatives peuvent être dues à la disparité entre les proportions d'antigènes et

d'anticorps entrant dans la réaction. L'absence d'arcs de précipitation peut aussi être expliquée par l'absence d'anticorps spécifiques dans les immuns sérums.

Concernant les doubles arcs de précipitation observés lors de certains tests, ils peuvent être expliqués par la présence d'au moins deux anticorps spécifiques différents qui reconnaissent deux déterminants antigéniques différents ainsi le nombre d'arcs de précipitation visibles correspond au nombre de complexes antigènes-anticorps formés.

D'un autre côté, le test réalisé avec la matière cérébrale de souriceaux ne contenant pas de virus rabique, nous a permis de conclure que les résultats obtenus avec la souche virale LPS produite par inoculation de souriceaux sont dus à la formation de complexes entre le virus LPS et ses anticorps spécifiques contenus dans l'immun sérum antirabique IPA et non à la réaction des protéines cérébrales avec l'immun sérum IPA malgré les rappels de vaccination et les quantités de matières cérébrales administrées aux chevaux.

Pour les tests d'immunodiffusion radiale, l'absence d'anneaux de précipitation à de faibles dilutions de vaccins est probablement dûe au fait que la concentration en antigènes vaccinaux dans le puits est très faible par rapport à la concentration en anticorps dans la gélose. La zone d'équivalence n'est donc pas atteinte.

Selon Ferguson et *al.* (1984), le dosage des vaccins antirabiques selon la méthode d'IDR comporte certaines limites. Certains vaccins ne peuvent pas être dosés par cette méthode comme les préparations de faible titre telles que les vaccins dérivés de tissu cérébral, ce qui n'est pas le cas dans notre travail car les vaccins testés sont conformes aux normes et leurs valeurs antigéniques sont supérieures à 0,3. Il est fort possible que si on avait à tester des vaccins avec des valeurs antigéniques inférieures à 0,3, nous n'aurions peut être pas abouti à la même conclusion, une étude dans ce sens pourrait vérifier cette hypothèse (étude en perspective).

Selon ces mêmes auteurs, les préparations dans lesquelles l'antigène rabique est adsorbé sur l'hydroxyde d'aluminium ne peuvent pas être dosées par IDR, ceci va dans le même sens que Mc Elhinney et *al.* (2012) qui ont discuté de la faible corrélation entre le test IDR et le test des NIH et de l'incapacité de l'IDR à être utilisé pour les vaccins avec adjuvant. Les vaccins que nous avons testés sont sans adjuvant.

Les valeurs antigéniques que nous avons obtenues par les tests d'IDR sont comprises entre 0,56 et 1,00, ce qui est en accord avec les travaux de Miceli et *al.* (2000) qui démontrent que l'IDR permet de déterminer des valeurs comprises entre 0,6 et 1,5.

La comparaison des trois catégories de vaccins dans le test d'IDR selon leurs valeurs antigéniques a montré une différence hautement significative ( $p=2,30510^{-16}$ ) et aucune variabilité n'existe entre les trois catégories en raison des valeurs constantes des VA exception faite pour les vaccins forts.

Concernant les résultats des tests des NIH, initialement les VA des trois catégories de vaccins ne montraient aucune différence significative ( $p=0,1$ ), ceci est dû aux quatre vaccins de la catégorie moyenne qui auraient engendré un profil unique pour les trois catégories de vaccins, mais une déclassification de ces vaccins a permis de modéliser le profil des trois catégories de vaccins entre lesquels une différence significative est révélée ( $p=0,026$ ).

L'étude de la variabilité et de la moyenne des  $DL_{50}$  des virus d'épreuve utilisés dans les tests des NIH des trois catégories de vaccins montre une différence hautement significative ( $p=5,7210^{-13}$ ), cette différence est maintenue même avec la nouvelle configuration.

Les  $DL_{50}$  des virus d'épreuve utilisés dans les tests des NIH augmentent avec les VA des vaccins testés, seulement il existe une indépendance ( $p=1$ ) et une dispersion entre la tendance de répartition de ces deux paramètres (VA des vaccins,  $DL_{50}$  des virus d'épreuve) ( $p<0,0001$ ).

La classification des vaccins selon les résultats de l'IDR a donné 44% de vaccins forts, 42% de vaccins moyens et 14% de vaccins faibles, à partir des résultats du test des NIH, cette classification a donnée 29% de vaccins forts, 52% de vaccins moyens et 19% de vaccins faibles. La comparaison des vaccins par paire entre les deux techniques NIH et IDR par la méthode d'Holm fait ressortir qu'il n'existe aucune différence significative entre les vaccins moyens ( $p=1$ ) et faibles ( $p=0,64$ ) des deux techniques, par contre une différence significative est observée entre les vaccins forts des deux techniques ( $p=0,001$ ).

Le rapprochement des résultats obtenus dans cette étude comparative est probablement dû à l'utilisation de réactifs très proches dans la technique d'IDR : la souche rabique LPS du vaccin et inductrice de l'immun sérum IPA, ainsi qu'à l'utilisation du même vaccin de référence dans les deux techniques, vaccin produit avec la souche rabique LPS.

Ferguson et *al.* (1984), Gairola et *al.* (2012) ont discuté de la mauvaise corrélation entre les deux techniques et n'encouragent pas le remplacement du test des NIH par celui de l'IDR pour déterminer l'activité du vaccin final mais proposent plutôt l'utilisation de l'IDR dans le contrôle de l'activité *in process* des lots de vaccins en vrac. Il faut souligner néanmoins que ces travaux concernent les vaccins antirabiques produits sur culture cellulaire et ne concordent donc pas avec notre étude sur les vaccins produits sur matière cérébrale de souris, travail qui montre que l'IDR et le NIH donnent des résultats assez proches.

De plus, lors de l'application de la technique d'IDR sur six vaccins avant contrôle par le test des NIH, dans le but de prédire les résultats des NIH, nous avons constaté que les résultats de quatre d'entre eux concordaient avec ceux du test des NIH.

Fitzgerald et Needy (1986) ont rapporté les résultats d'une enquête sur un lot de vaccins humains périmés qui n'ont pas répondu au test des NIH mais qui par contre ont fonctionné avec succès dans le test d'IDR, dans notre travail tous les vaccins testés étaient en cours de validité et stockés convenablement à +4°C.

De même Lyng et *al.* (1992), lors d'une étude sur la stabilité des vaccins, ont montré une faible corrélation des résultats du test d'IDR et du test des NIH, nous n'avons pas été confronté à cet aspect qui n'a pas été l'objet de notre travail, d'où l'impossibilité de comparer nos résultats.

Ferguson et Schild (1982) ont conclu que les tests d'IDR sont simples, rapides, reproductibles et susceptibles d'être d'un intérêt considérable pour le dosage *in-vitro* de la teneur en glycoprotéine des vaccins antirabiques. Toutefois les tests *in-vitro* ne fournissent pas de preuves irréfutables de l'antigénicité et doivent être complétés par des tests *in-vivo* ; cependant, une fiabilité des tests *in-vitro* présente l'avantage de réduire la dépendance aux tests *in-vivo* qui sont souvent soumis à une grande variabilité.

Ces auteurs mettent aussi l'accent sur le fait que le test IDR ne peut pas faire de distinction entre les deux formes de la glycoprotéine G contenues dans le vaccin antirabique, mais il peut être utilisé en cours de fabrication d'un vaccin pour contrôler la teneur en glycoprotéine totale. En effet, le contrôle du produit fini par des méthodes *in-vitro* nécessite l'identification et l'utilisation de réactifs appropriés comme un anticorps monoclonal avec une spécificité pour l'épitope de neutralisation de la forme trimère de la glycoprotéine G.

La validation des tests *in-vitro* de remplacement devra comporter l'identification des lots faibles. Selon Stokes et *al*, 2012, pour valider les méthodes *in-vitro* dans les tests d'activité des vaccins contre la rage humaine, il peut être nécessaire de comparer les résultats obtenus *in-vitro* avec des titres sérologiques adéquats chez l'homme, un travail dans ce sens est en cours dans le cadre du suivi du vaccin tissulaire et sa réponse chez l'homme (Brahimi & Belkaid, 2013, travaux non publiés).

**Chapitre V**  
**Conclusion et**  
**recommandations**

Lors de ce travail nous sommes parvenus à atteindre notre objectif principal qui consistait en la mise au point de la technique d'immunodiffusion radiale pour le contrôle de l'activité des vaccins antirabiques tissulaires inactivés à usage humain produits par l'IPA.

Pour cela nous avons eu recours à la technique d'immunodiffusion double d'Ouchterlony pour la recherche des anticorps spécifiques dans les immuns sérums antirabiques qui reconnaîtraient les déterminants antigéniques de la souche LPS, souche utilisée pour la production du vaccin antirabique tissulaire IPA.

C'est ainsi que l'immun sérum antirabique IPA a été sélectionné pour être utilisé dans la technique d'immunodiffusion radiale de Mancini pour déterminer la valeur antigénique des vaccins. L'incorporation de cet immun sérum dans la gélose avec un taux de protéines de 15,40 $\mu$ g/ml a permis l'apparition d'anneaux de précipitation mesurables, permettant ainsi la détermination des valeurs antigéniques des vaccins par le report des diamètres des anneaux de précipitation sur la courbe d'étalonnage établie à partir du vaccin de référence.

Un pied à coulisse a servi pour la mesure des diamètres des anneaux de précipitation. Cette mesure aurait été plus précise si un matériel adéquat avait été disponible. Investir dans un appareil de lecture des plaques IDR serait intéressant pour l'IPA car le nombre de lots de vaccin produits par an est assez important d'autant plus que cette technique est aussi utilisée pour contrôler d'autres vaccins.

Notre étude a portée sur soixante-dix-sept vaccins antirabiques tissulaires inactivés fabriqués et commercialisés par l'Institut Pasteur d'Algérie. Les résultats des tests de l'IDR et des NIH ont permis le classement de ces vaccins en trois catégories (vaccins forts, moyens et faibles). D'autre part, les résultats obtenus par la technique de l'IDR ont fait l'objet d'une étude comparative avec le test des NIH, régulièrement utilisé pour le contrôle des vaccins antirabiques au niveau de l'IPA. L'étude statistique a révélé que les deux tests ont conduit à des valeurs assez proches, en effet aucune différence significative n'a été notée entre les vaccins classés faibles et moyens des deux techniques ( $p = 0,64$  et  $p = 1$  respectivement), par contre une différence significative est notée entre les vaccins forts des deux techniques ( $p = 0,001$ ).

Pour un meilleur suivi des lots de vaccins produits, il serait judicieux de faire une étude sur une longue période durant laquelle les tests des NIH et IDR seraient lancés simultanément, on pourrait ainsi vérifier la fiabilité de la technique IDR pour prédire les résultats du test des NIH en un temps beaucoup plus court.

La technique d'immunodiffusion radiale étant essentiellement utilisée pour le contrôle de l'activité des vaccins antirabiques cellulaires inactivés, il serait intéressant de faire une étude expérimentale sur les vaccins de culture cellulaire de l'IPA à usage vétérinaire après leur inactivation.

Etant donné que les vaccins antirabiques tissulaires produits par l'IPA sont à usage humain, il serait intéressant d'envisager une collaboration avec d'autres laboratoires afin de déterminer la concordance entre les résultats de l>IDR et le taux d'anticorps antirabiques chez l'homme par contrôle sérologique.

Nos résultats sont encourageants et méritent d'être poursuivis et approfondis pour faire de l>IDR une technique de contrôle de l'activité du vaccin antirabique tissulaire inactivé sur le produit fini, ou du moins pour prédire les résultats du test des NIH, car peu coûteuse et fiable elle permet d'avoir une idée sur l'activité des vaccins en un temps très court (96h maximum).

# **Références bibliographiques**

**Références bibliographiques**

**Acha P.N., & Szyfres B., (2001).** *Zoonose et maladies communes à l'homme et à l'animal-* 13<sup>ème</sup> édition.

**Andral L., & Blancou J., (1982).** *La rage ; Nouveaux développements en matière de vaccination Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.,* 1982, 1 (4), 895-930. Rapport présenté à la 50e Session Générale de l'O.I.E., Paris, 24-29 mai 1982.

**Arko R.J., Wiktor T.J., & Sikes R.K., (1973).** *The antibody binding test for vaccine potency.* In: Kaplan M.M. & Koprowski H., ed. *Laboratory techniques in rabies.* 3.ed. Geneva, WHO, p. 292-294.

**Atanasiu P., Perrin P., & Delagrèau J., (1980).** *Use of an enzyme immunoassay with a protein A for rabies antigen and antibody determination.* *Developments in biological standardization,* 46: 207-215.

**Aubert M. F. A., & Blancou J., (1982).** *Test simplifié de contrôle d'activité des vaccins antirabiques à virus inactivés.* *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz-,* 1, 811-821.

**Aubry P., & Rotivel Y., (2001)** *Rage. Encyclopédie Médico-Chirurgicale* (Elsevier Masson)

**Balter C., Bienvenu J., & Lopez J., (2006)** *Réaction antigène-anticorps,* 2<sup>ème</sup> édition.

**Banerjee, A.K., (1987).** *Transcription and replication of rhabdoviruses.* *Microbiol Rev,* 51, 66-87.

**Barth R., & Jaegera O., (1978).** *Zur Wirksamkeitsprüfung von inaktivierten tollwut Gewebekulturimpfstoffen in NIH test. Zentrablatt fur Bacteriologie Parasitenkunde. Infektionskrankheiten and gygiene* 1 Orig. (B). 169 ; 488-494.

**Barth R., Gross-Albernhausen E., Jaeger O., & Milcke L., (1981).** *The antibody binding test, a useful method for quantitative determination of inactivated rabies virus antigen.* *J. biol. Stand.,* 9: 81- 89.

**Bégué P., Girard M., Bazin H., Bach J-F., (2012).** *Commission VII (maladies infectieuses et médecine tropicale) Groupe de travail sur Les adjuvants vaccinaux: quelle actualité en 2012* Académie nationale de médecine 1-32.

**Benhabyles N., (2008)** *Epidémiologie de la rage en Algérie- projet RABMED CONTROL.*

**Benmasour A., & Brahim M., (1988).** *Results in the purified cell culture vaccine for man use "New development in rabies control", IMVI/WHO Symposium Essen, FRG 5-7 July 1988.*

**Bleck, T. P., Rupprecht, C. E., (2000).** *Rabies Virus.* In *Principle and Practice of Infectious Diseases* (G. L. Mandell, Douglas, Robert Gordon, Bennett, John Eugene, Dolin, Raphael, ed.) Fifth Edition, Churchill Livingstone (Philadelphia - London - Toronto - Montreal - Sydney - Tokyo - Edinburgh) Vol 2:1811-19, Chapter 151.

**Bourhy H., Rollin PE., Vincent J., Sureau P., (1989).** *Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies.* J Clin Microbiol ;27:519-23.

**Bourhy H., (2003).** *Développements récents de l'épidémiologie des infections à Lyssavirus et conséquences pour l'homme.* Mémoires. Bull. Acad. Vét. France — Tome 156 - N° 2.

**Brahimi M., (1992).** *First case of isolation of canine parvovirus in Algeria,* North African Veterinary Congress, 12-15 Octobre 1992 Tripoli.

**Brahimi M., & Benmansour A., (1986).** *Rabies vaccines for human; use produced in Algeria, development prospects.* Scientific workshops on rabies, Pasteur Institute of Algeria, December 20, 1986.

**Brahimi M., & Benmansour A., (1988).** *Development of inactivated rabies vaccines; A comparative study of the immunogenicity and efficacy of dogs.* Veterinarians Maghreb VI Days, May 13, 1988.

**Charlton K. M., (1994).** *The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies.* Curr Top Microbiol Immunol 187, 95-119.

**Chen T., & Chen K., (2009).** *Investigation and application progress of Vero cell serum-free culture.* International Journal of Biology, 1(2), 41-47.

- Childs J.E., & Real L.A., (2007).** *Epidemiology rabies*. Second Edition London, Elsevier 123.
- Clarck H.F., & Wiktor T.J., (1972).** *Rabies virus*. In Strains of Human Viruses, 177-182, ed by Majer and Plotkin (Karger, Basel).
- Cora C., (2009).** *La rage chez les chiroptères en France métropolitaine*, page 56. Université Henri POINCAR Nancy 1.
- Cox, J.H., Dietzschald B., Schneider L.G., (1977).** *Rabies virus glycoprotein.II*. biological and serological characterisation. *Infection and Immunity*, 16, 754-759.
- Crowle A.J., (1973).** *Immunodiffusion* (2e édition) Academic Press, New York
- Dacheux L., & Bourhya H., (2011).** *Diagnostic de la rage*, revue francophones des laboratoires, mars, n°403, 33-40 : 34.
- Delmas O., Holmes EC., Talbi C., Larrous F., Dacheux L., et al., (2008).** *Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses*. PLoS ONE;320-57.
- Diaz A.M., (1985).** *Técnica de contrainmunolectroforesis para el diagnóstico serológico de la rabia*. Ramos Mejía, Centro Panamericano de Zoonosis OPS/OMS,. (Monografía. No. 13).
- Dietzschold B., Wiktor TJ., Wunner WH., Varrichio A., (1983).** *Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein*. *Virology*; 124-330-337.
- Dietzschold B., et al., (1987).** *Antigenic Variation in Rabies and Rabies-Related Viruses: Cross-Protection Independent of Glycoprotein-Mediated Virus-Neutralizing Antibody*. *J. Infect. Dis.*, 156 (5), 815-822.
- Fekadu M., Endeshaw T., Alemu W., Bogale Y., Techager T., & Olson J.G., (1996).** *Possible human-to-human transmission of rabies in Ethiopia*. *Ethiopian Medical Journal* 34, 123-127.
- Ferguson M., Seagroatt V., Schild GC., (1983).** *A collaborative study on the use of single-radial immunodiffusion for the assay of rabies virus immunglycoprotein*. WHO/BS/; 142:1-14.
- Ferguson M., & Heath A., (1992).** *Report of a collaborative study to assess the determination of glycoprotein antigen content of rabies vaccines for human use*. *Biological* 20, 143-154.

**Ferguson M., & Schild G.C., (1982).** *A single radial immunodiffusion technique for the assay of rabies glycoprotein antigen: application for potency tests of vaccines against rabies.* J. gen. Virol., 59: 197-201.

**Ferguson M., & Schild G.C., (1982).** *A single radial immunodiffusion technique for the assay of rabies glycoprotein antigen: Application for potency tests of vaccines against rabies.* J. gen. Virol. 59, 197-201.

**Ferguson M., Seagroatt V., Schild G.C., (1984).** *A collaborative study on the use of single radial immunodiffusion for the assay of rabies virus glycoprotein.* Journal of biological standardization 12, 283-294.

**Ferguson M., Wachmann B., Charles F., Needy., Edward A., Fitzgerald., (1987).** *The effect of strain differences on the assay of rabies virus glycoprotein by single radial immunodiffusion.* Journal of Biological Standardization 15, 73-77.

**Ferguson, M., & Schild, G.C., (1982).** *A single radial immunodiffusion technique for the assay of rabies glycoprotein antigen: application for potency tests of vaccines against rabies.* J. GEN. Virol.,59 : 197-201,.

**Fitzgerald EA., Needy CF., (1986).** *Use of the single radial immunodiffusion test as a replacement for the NIH mouse potency test for rabies vaccine.* Develop Biol Standard 9; 64:73.

**Gairola S., et al., (2012).** *Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward.* Biologicals 40, 369-381.

**Georget M., (2009).** *Vaccinations, les vérités indésirables,* 3ème Ed. 2009, p.92.

**Grainger CI., (2007).** *Stabilisation of viral microparticles.* United States Patent, N°0098740

**Grasset N., Atanasiu P., (1961).** *Annales Institut Pasteur,* 101, 639-647.

**Grezel, D., (2006).** *Types de vaccins-composition et considérations pratiques.* Adresse URL: [www2.vet-lyon-fr/ens/immune/ENV\\_immune\\_2A/immuno3-06htm](http://www2.vet-lyon-fr/ens/immune/ENV_immune_2A/immuno3-06htm). In: Yahiaoui F.,(2011) Evaluation sérologique des vaccins utilisés en Algérie.

**Habel K., (1973).** *Habel test for potency.* In laboratory techniques in rabies, 3rd. edn., pp 276-277. Edited by M.M. Kaplan & H. Koprowski. Geneva ; World Health Organisation.

**Habel K., (1940).** *Evaluation of a mouse test for the standardization of the immunizing power of anti-rabies vaccines.* Publ. Hlth. Rep., Wash. 55, No. 33, 1473-1487.

**Halonen P.E., Murphy F.A., Fields B.N., & Reese D.M., (1968).** Proc. Soc. Exp. Biol (N.Y), 127.1037.

**Hendekli, C. M., (2005).** *Current therapies in rabies.* Arch Viro, 150, 1047-57.

**Hendriksen C., Spieser J.M., Akkermans A., & al., (1997).** *Validation of alternative methods for the potency testing of vaccines.* The report and Recommendation of European Centre for the Validation of Alternative Methods. Workshop 31. Italy, JRC Environment Institute.

**INSP (2011).** Relevé Epidémiologique Mensuel

**Jadhav SS., Dogar V., Gautam M., Gairola S., (2009).** *Stability testing of vaccines: Developing countries vaccine manufacturers' network (DCVMN) perspective.* Biologicals 37, 360-363.

**Johnson N., Cunningham AF., Fooks AR., (2010)b.** *The immune response to rabies virus infection and vaccination.* Vaccine, 28, 3896-3901.

**Johnson N., Vos A., Freuling C., Tordo N., Fooks AR., Müller T., (2010)a.** *Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin.* Vet Microbiol, 142, 151-159.

**Kaplan MM., & Koprowski H., (1974).** *La rage : technique de laboratoire.* 3ème Ed, OMS, Genève, 379 pages.

**Kuwert E., Wiktor T.J., Sokol F., Koprowski H., (1968)** J. Virol. 2. 1381.

**Lafon M et al., (1985).** *Use of monoclonal antibody for quantitation of rabies vaccine glycoprotein by enzyme immunoassay.* Journal of biological standardization.. 13: 295-301.

**Lambot M., Blasco E., Barrat J., Cliquet J., Brochier B., Renders C., Krafft N., Bailly J., Munier M., Aubert M.F.A., Pastoret P., (2000).** *Humoral and cell-mediated immune responses of foxes (*Vulpes vulpes*) after experimental primary and secondary oral vaccination using SAG2 and V-RG vaccines.* Vaccine, 19, 1827–1835.

**Lecocq J.P., Kieny M.P., (1985).** *La biologie moléculaire du virus rabique.* Ann. Méd. Vét., 129, 249-261.

**Lefranc MP., (2004).** *Immunogenetics*, [en-ligne], mise à jour en 2003 [<http://imgt.cines.fr>], consulté le 11 Avril 2004). In Imbert A-M T., (2005) *Les immunoglobulines colostrales bovines : étude comparée de trois méthodes de dosages à partir de données expérimentales et influence de différents facteurs sur la concentration.*

**Lembo T., Niezgoda M., Velasco-Villa A., Cleaveland S., Ernest E., et al., (2006).** *Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis.* Emerg Infect Dis;12:310-3.

**Lépine P., (1967).** *Techniques de diffusion en milieu gélifié* 8, 89-96.

**Lépine P., Atanasiu P., (1967).** *Production de sérum antirabique d'origine animale*, chapitre 37 : 307-312.

**Libeau G., Lafon M., Rollin P., (1984).** *Etude de la spécificité d'anticorps rnonoclonaux obtenus avec la souche de virus de rage Pasteur PV.* Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux, 37: 383-394.

**Lumlertdacha B., (2005).** *Laboratory Techniques for Rabies Diagnosis in Animals* at QSMI.

**Lyman D., (2001).** *Cat bites: a source of rabies exposure in rural Tennessee.* Tenn Med **94**, 95-7.

**Lyng J., Bentzon MW., Ferguson M., Fitzgerald EA., (1992).** *Rabies vaccine standardization: international collaborative study for the characterization of the fifth international standard for rabies vaccine.* Biologicals 13; 20:30.

**Mancini G., Carbonara AO., Heremans JF., (1965).** *Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.* Immunochemistry,; 2: 235-254.

**Mancini G., Carbonara A.O., & Heremans J.F., (1965).** *Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.* Immunochemistry, 2: 235-254,.

**Manuel terrestre de l'OIE (2005).** *Rage* chapitre 2.2.5. page :269-389.

**McElhinney L., et al., (2012).** *Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward.* Biologicals 40, 369-381.

**McElhinney LM., Fooks AR., Radford AD., (2008).** *Diagnostic tools for the detection of rabies virus.* EJCAP , 18(3), 224-231.

## **Références bibliographiques**

---

**Mecili G S., Torroba J., Torres W., Esteves Madero J., Diaz A M., (2000).** *Evaluation of standard reagents for radial immunodiffusion assays. In vitro control of rabies vaccines.* Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 42 (3): 153-156, May-June 2000.

**Melnick JL., (1989).** *Vaccins viraux : principes et perspectives.* Bulletin OMS, 67(3), 253-261.

**Merklen F.P., Berthaux P., Moulias R., (1973).** *Précis d'immunologie I immunologie générale* page 287.

**Meslin FX., Kaplan MM., Koprowski H., (1999).** *La rage: technique de laboratoire.* 4ème Ed, OMS, Genève, 485 pages.

**Muller, T., Selhorst, T., and Potzsch, C., (2005).** *Fox rabies in Germany - an update.* *Euro Surveill*, 10. [<http://www.eurosurveillance.org/em/v10n11/1011-228.asp>]

**OIE, (2005).** *Fiche technique en anglais sur la rage,* [<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rabies.pdf>]. Consulté le 11 février 2009 In : Chaix G., (2009) Analyse critique des récents cas de rage de mammifères terrestres survenus en France.

**OIE, (2005) :** *Fiche technique en anglais sur la rage,* [<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rabies.pdf>].

**Perrin P., Morgeaux S., Sureau P., (1990).** *In-vitro rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immunocapture method with a neutralizing antiglycoprotein monoclonal antibody* Biologicals, , 18: 321-330.

**Piednoir E., (2012).** *La vaccination.* Journée Réseau Régional Hygiène 25/10/2012.

**Pilette J., (2009).** *Constituants des vaccins.* 6ème Ed, 110 pages.

**Plotkin S et al., (2008).** *Rabies vaccines.* In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. *Vaccines*, 5<sup>th</sup> edition, Saunders Elsevier, 687–714.

**Plotkin SA., & Koprowski H., (1994).** *Rabies vaccines*, chapter in: *Vaccines*, eds. SA Plotkin, EA Mortimer, II ed., WB Saunders, Philadelphia, 649-670.

*Report of the Joint WHO, German Green Cross information Discussion on Bat Rabies in Europe, Marburg, 54 May 1986.* Geneva, World Health Organization, 1986 (unpublished)

document WHO. Rab. Res./86.24; available on request from the Division of Communicable Diseases, World Health Organization, 121 1 Geneva 27, Switzerland).

**Richard Y., (1990).** *Adjuvants de l'immunité* Chapitre 66: 685- 689: Immunologie animale « Flammarion » Paris 737p.

**Richmond J., (2000).** *Expérimentation animale : biologie, éthique, réglementation.* Scand J Lab Anim Sci, 27, 84- 92 - Veissier I Prod Anim 1999, 12, 365-375. In : <http://extranet.inserm.fr/recherche-pre-clinique/l-experimentation-animale/la-regle-des-3-r-reduire-raffiner-replacer>.

**Rossister J.P., & Jackson A.C., (2007).** *Pathology.* Rabies second Edition Elsevier 383-403.

**Rotivel Y G. M., Bourhy H., Tsiang H., (2001).** *La rage des chiroptères en France. Actualités et importance en sante publique.* Bulletin épidémiologique hebdomadaire 39:189-190.

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

**Rupprecht, C. E., & Gibbons, R. V., (2004).** *Clinical practice.* Prophylaxis against N ENGL J MED, 351(25), 2626- 2635. In : Belakehal F., (2011). *Etude de la thermostabilité du virus rabique (ERA/SAD) en milieux stabilisants.*

**Sampath G., Madhusudana SN., Sudarshan MK., Ashwathnarayana DH., Mahendra BJ., Ullas TP., Mohan K., Madhusudhan SK., Ravish HS., (2010).** *Immunogenicity and safety study of Indirab : A Vero cell based chromatographically purified human rabies vaccine.* Vaccine, 28, 4086–4090.

**Scheidegger J.J., (1955)** Int. Arch. Allergy, 7, 257.

**Schild G.C., Wood J.M., & Newman R.W., (1975).** *A single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen. Proposals for an assay method for the haemagglutinin content of influenza vaccines.* Bull. Wld. Hlth. Org., 52: 223-231.

**Schild G.C., Wood J.M., Minor P.D., Dandawate C.N., & Magrath D.I., (1980).** *Immunoassay of poliovirus antigens by single-radial-diffusion: development and characteristics of a sensitive autoradiographic zone site enhancement (ZE) technique.* J. gen. Virol., 51: 157-170,.

**Seligman E.B JB., (1973).** *The NIH test for potency In laboratory techniques in rabies*, 3rd. edn., pp 279-286. Edited by M.M. Kaplan & H. Koprowski. Geneva ; World Health Organization.

**Seligman E.B JB., (1955).** *La rage technique de laboratoire*, chapitre 33, page 287-294.

**Seligmann EB JB., (1973).** *The HIH test for potency.* In: Kaplan MM. and Koprowski H., eds. *Laboratory techniques in Rabies*. 3<sup>rd</sup> edn. Geneva: World Health Organization,; 279-286. Site de la communauté éducative de l'enseignement agricole public français, [en-ligne], mise à jour en 2004, [<http://www.educagri.fr>], (consulté le 12 Aout 2013). Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche et de la ruralité,

**Smith J.S., (1991).** *Rabies serology.* In : *The natural history of rabies*, 2nd Edition (G.M. Bear,

**Smith J.S., Orciari L.A., Yager P.A., Seidel H.D., Warner C.K., (1992).** *Epidemiologic and Historical Relationships among 87 Rabies Virus Isolates as Determined by Limited Sequence Analysis.* *J. Infect. Dis.*, 166, 296-307.

**Smith JS., Yager PA., Baer GM., (1996).** *Epreuve rapide en culture tissulaire pour la détermination de l'anticorps neutralisant.* In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, Editors. *La rage, techniques de laboratoire.* Genève: Organisation mondiale de la Santé ;366-70.

**Smith, J. S., (2003).** *Rabies Virus.* In *Manual of Clinical Microbiology* (P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller and R. H. Tenover, eds.), 8th ed. Vol. 2, 1544-1552. ASM Press (American Society for Microbiology), Washington, DC.

**Stokes W et al., (2012).** *Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: State of the science and planning the way forward.* *Biologicals* 40, 369-381.

**Suwansrinon K., et al., (2007).** *Sex- and age-related differences in rabies immunoglobulin hypersensitivity.* *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2007, 101:206–208

**Suwansrinon K., Wilde H., Benjavongkulchai M., et al., (2006).** *Survival of neutralizing antibody in previously rabies vaccinated subjects: a prospective study showing long lasting immunity.* *Vaccine*, , 24(18):3878-80.

**Thevenot M., (2009).** *L'entente interdépartementale de lutte contre la rage et les autres zoonoses : son histoire, ses actions.* Page 25

**Thraenhart O., (1989).** *Evaluation de l'innocuité et de l'activité des vaccins antirabiques* Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1989, **8** (4), 845-847

**Tordo N., (1996).** *Characteristics and molecular biology of the rabies virus.* In Laboratory Techniques in Rabies, 4ème édition, chap 3, 28-51, ed by F.-X. Meslin, M.M. Kaplan et H. Koprowski, WHO Geneva.

**Villemot J.M., Provost A., (1958).** rev. Elev., 11, 387-397.

**Warrell MJ., & Warrell DA., (2004).** *Rabies and other lyssavirus diseases.* The Lancet, 363, 959.

**WHO (1979).** *Rabies Vaccine.* WHO Tech Rep Ser 1979; 638:15.

**WHO (1983).** *Rabies Vaccine.* WHO Tech Rep Ser 1983; 700:15.

**WHO (1984).** *Expert Committee on Rabies. Seventh report.* Geneva, World Health Organization, (WHO Technical Report Series, No. 709).

**WHO (1992).** *Requirements for MMR and combined vaccine (live).* TRS 840. Annex 3.

**WHO (2005).** *Expert Consultation on Rabies : first report Genève,* Organisation mondiale de la santé, (Série de rapports techniques de l'OMS N°931 ; [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_931\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_931_eng.pdf)).

**WHO (2007).** *Epidemiology: the burden of disease. In Rabies and envenomings: a neglected public health issue: report of a Consultative Meeting.* Genève. Chapitre 2. 13-15. [en ligne], [[http://www.who.int/bloodproducts/animal\\_sera/Rabies.pdf](http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf)]. Disponible sur : [[http://www.who.int/bloodproducts/animal\\_sera/en/](http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/en/)]. Consulté le 06 octobre 2009. In : Chaix G., (2009) Analyse critique des récents cas de rage de mammifères terrestres survenus en France.

**WHO (2013).** Expert consultation on rabies second report. WHO technical report series; Geneva: WHO,2013 ; in press.

**Wiktor T.J., Atanasiu P., Bahmayar M., beogel K., Cox J.H., Diaz A.M., Fitzgerald E.A., Kuwerdt E., Netter R., Selimov M., Turner G., Van Steenis G., (1978).** *Comparaison studies on potency tests for rabies vaccine.* Developments in Biological Standardization 40. 171-178.

**Wilde H., et al., (1989).** *Immunoglobuline équine antirabique purifiée: un substitut de l'immunoglobuline humaine antirabique sûr et relativement peu coûteux.* Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, 67:731–736.

**Wood J.M., Schild G.C., Newman R.W., & Seagratt V., (1977).** *An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines.* J. biol. Stand., 5: 237-247,

**Xu G., Weber P., Hu Q., Xue H., Audry L., et al., (2007).** *A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies.* Biologicals ;35:297-302.

### Nétographie

Double diffusion en milieu gélifié : interprétation des lignes de précipités

<http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/immuno/LePoly/Chap.IV/IV-13.html> consulté le 05/06/2012

Principe de la technique de Mancini

<http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/methods/methods.html> consulté le 10/12/2013.

Principe de la technique d'Ouchterlony

[http://www.pedagogie.ac-nantes.fr/1259158608301/0/fiche\\_ressourcepedagogique](http://www.pedagogie.ac-nantes.fr/1259158608301/0/fiche_ressourcepedagogique) consulté le 05/06/2012.

Cycle de réplication du virus rabique :

<http://www.microbe-edu.org/etudiant/rhabdoviridae.html> consulté le 23/09/1013.

Représentation de la courbe de précipitation

<http://www.toutsurlatransfusion.com/immuno-hematologie/ih/prozone.php> consulté le: 15/04/2013.

Lecteur de plaques IDR (IDRing® Plates)

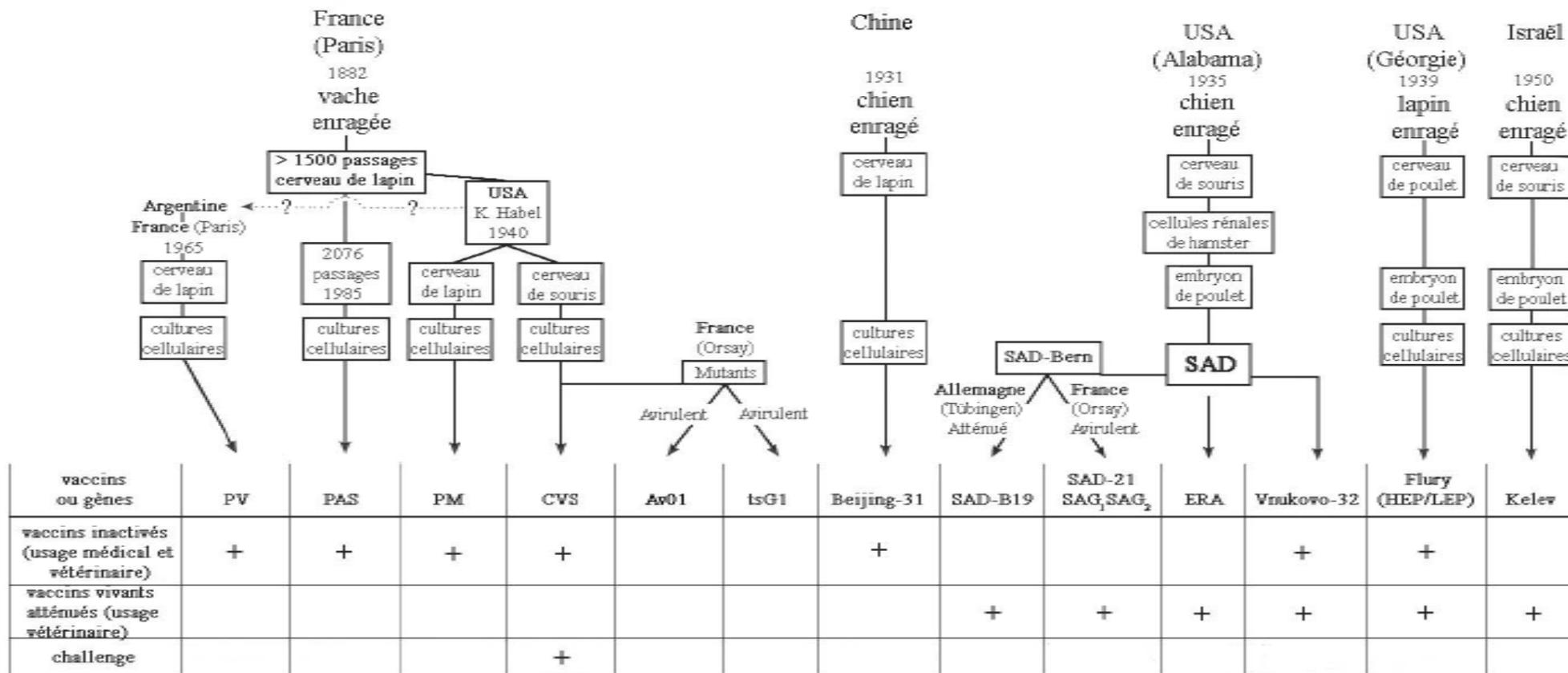
<http://www.idbiotech.fr/16-lecteur-numerique-de-plaques-idr.html> consulté le 08/09/1013.

Distribution mondiale de la rage WHO (2012)

[www.who.int/ith](http://www.who.int/ith) consulté le 11/10/2013.

# **Annexes**

Annexe 1 : Origine des principales souches fixes de virus rabiques (génotype 1) utilisées pour la préparation de vaccins (Tordo, 1996)



PV : Pasteur Virus ; PAS : Souche Louis Pasteur ; PM : Pitman-Moore ; CVS : Challenge Virus Standard ; Av01 : Variant Avirulent 01 de CVS ; mutant tsG1 : mutant thermosensible Gif 1 (mutation sur la glycoprotéine du résidu leucine 132 en phénylalanine) ; Beijing-31 : souche issue d'un chien enragé en 1931, à Beijing ; SAD : Street Alabama Dufferin ; SAD-B19 : souche atténuée allemande clonée à partir de la souche SAD-Berne (Suisse) ; SAG1 et SAG2 : Street Alabama Gif 1 et Gif 2 (mutants de la souche SAD-Berne, portant une ou deux mutations sur une ou deux bases du même codon 333) ; ERA : Evelyn-Rokitnicki-Abelseth ; Vnukovo-32 : souche issue de SAD en ex-URSS ; Fleury HEP et LEP : souches avianisées Hight Egg Passage et Low Egg Passage. Le lien indiqué en pointillé sur la figure entre la souche à l'origine de PM et CVS, et celle à l'origine de PV est remis en cause par les récentes études de biologie moléculaire, qui rapprochent plutôt la souche PV des souches SAD/ERA et Beijing (**Smith *et al*, 1992**).

## **Annexe 2 : Test de Habel**

Un groupe de 60 souris (souris Swiss blanches, âgées de 4 à 6 semaines d'un poids équivalent) reçoivent 0,25 ml d'un vaccin dilué de façon à obtenir une préparation à 0,5 % de tissu cérébral de départ. Les inoculations sont faites par voie intra péritonéale 3 fois par semaine pendant 2 semaines consécutives (six inoculations au total).

Trente souris mises à part au début serviront de témoins au moment de l'inoculation d'épreuve qui est effectuée le 14<sup>ème</sup> jour après la première injection du vaccin.

Le virus d'épreuve CVS est dilué de façon à obtenir une suspension à  $10^{-1}$ . Des dilutions en série de raison 10, de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$  sont faites en utilisant comme diluant une solution à 2% dans de l'eau distillée de sérum de lapin ou de cheval décomplémenté par la chaleur ( $56^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes).

Des groupes de 10 souris vaccinées sont alors éprouvées par voie intracérébrale avec 0,03 ml des dilutions à  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ . Les souris témoins sont inoculées avec les dilutions  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  du virus à fin de déterminer quelle dilution représente la  $DL_{50}$ . Si le virus d'épreuve est pleinement actif, ces 3 dilutions donneront généralement de 100% à moins de 50% de survivant.

Pour que l'épreuve du pouvoir immunisant soit considérée comme valable, il faut que le point 50% (dilution correspondant à 50% de mortalité de rage) soit situé au-delà de la dilution  $10^{-5}$  chez les souris témoins.

Toutes les souris sont observées pendant 14 jours et seules les morts survenant après le 5<sup>ème</sup> jour sont considérées comme dues à la rage. Les souris doivent être observées quotidiennement et les symptômes enregistrés. Pour le calcul de l'activité du vaccin, les souris survivant à la fin des 14 jours mais montrant des symptômes nets de rage sont considérées comme des souris mortes de rage.

L'activité du vaccin contrôlé est exprimée par l'indice de Habel qui est obtenu en effectuant la différence entre les logarithmes des doses entraînant la mortalité à 50% des animaux vaccinés de celui des animaux témoins (**Habel, 1940**).

Annexe 3 : Sensibilité des divers dosages immunologiques (Rose *et al*, 1986 et 1997)

Dosage	Sensibilité * ( $\mu\text{g}$ anticorps/ml)
Réaction de précipitation en milieu liquide	20-200
<b>Réactions de précipitation en gels</b>	
Immunodiffusion radiale de Mancini	10-50
Immunodiffusion double d'Ouchterlony	20-200
Immunoélectrophorèse	20-200
Electrophorèse en fusée	2
<b>Réactions d'agglutination</b>	
Directes	0,3
Agglutination passive	0,006-0,06
Inhibition d'agglutination	0,006-0,06
Dosage radio-immunologique	0,0006-0,006
ELISA ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )	< 0,0001-0,01
ELISA utilisant la chimioluminescence	< 0,0001-0,01
Immunofluorescence	1,0
Cytométrie en flux	0,06-0,006

La sensibilité dépend de l'affinité de l'anticorps, ainsi que de la densité et de la distribution de l'épitope

**Annexe 4: Protocol de préparation de vaccins antirabiques souriceaux  
inactivés à la BPL**

**Volume initial :** 15 L

**Souche virus rabique :** L.P.Saigon 20<sup>ème</sup> passage

**Diluants :**

- solution Enders pH=7,2
- solution de saccharose 1500g/15 L de vaccins

**Stérilisation :**

- solution de Enders filtrée sur millipore 0,22  $\mu$  et autoclavée 1 h à 120°C.
- solution de saccharose filtrée sur millipore monté d'un préfiltre et membrane : 0,8-0,4 et 0,22  $\mu$

**Centrifugation :** 1 h à 3000g/min

**Inactivation :**  $\beta$  propiolactone (BPL) environ 4 ml

**Conservateurs :**

- Thiomersal : 1 gr
- Kanamycine : 3 gr

## Annexe 5 : Notice de l'immun sérum antirabique IPA

 <b>Institut Pasteur d'Algérie</b> Route du Petit Staouéli - Dely-Brahim - Alger	
<b>SÉRUM ANTIRABIQUE IPA</b> Sérum Antiviral Purifié	
<b>DESCRIPTION :</b> Sérum antiviral d'équidés hyperimmunisés avec le virus rabique (souche L-P Saigon), et purifié par voie enzymatique.	
<b>COMPOSITION :</b> 1 ml du sérum antirabique IPA contient des fragments F(ab)'2 d'immunoglobulines équine rabiques ayant un titre neutralisant minimum de 200 UI. Liste des excipients : Chlorure de sodium, Merthiolate, Sodium bicarbonate, Eau PPI	
<b>FORME PHARMACEUTIQUE ET PRESENTATION :</b> Solution injectable en IM. Boîte de 08 flacons de 5 ml.	
<b>FABRICANT :</b> Institut Pasteur d'Algérie (annexe El-Hamma)-Alger	
<b>INDICATIONS :</b> Le sérum antirabique IPA est indiqué dans le cas de morsures graves par un animal suspect, quel que soit le temps écoulé depuis la morsure. Le Sérum Antirabique IPA est à administrer exclusivement en association avec la vaccination rabique, selon les recommandations du Comité OMS d'experts de la rage à l'unique exception des patients déjà immunisés par une vaccination rabique et pouvant présenter des documents attestant la vaccination par un vaccin rabique c'est-à-dire une vaccination pré-exposition complète dans l'année précédente, une injection de rappel consécutive à la primo-vaccination dans les cinq années précédentes si vaccination effectuée avec un vaccin produit par culture cellulaire. Ces personnes peuvent recevoir le sérum seul.	
<b>POSOLOGIE :</b> La dose à administrer est de 40 UI/kg sans jamais être inférieure à 800 UI. Pour déterminer le volume à injecter, se référer au poids de la personne mordue et au titre du sérum inscrit sur la boîte.	
<b>MODE D'ADMINISTRATION :</b> Il est recommandé de ne pas injecter en une seule fois la dose calculée. Tester d'abord la sensibilité du sujet en injectant 0,10 ml à la face antérieure du bras. Attendre 15 minutes : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Si au bout de ce laps de temps aucune réaction allergique n'est observée, injecter la dose de sérum calculée, par voie intramusculaire.</li> <li>- Si une réaction allergique est constatée, appliquer la méthode BESREDKA.</li> </ul>	
<b>NB :</b> Dans le cas de morsure profonde et après nettoyage de la plaie, il est recommandé : <ul style="list-style-type: none"> <li>- d'appliquer du sérum antirabique par insinuation prudente en profondeur dans la blessure par infiltration autour de la plaie.</li> <li>- de ne pas suturer immédiatement la plaie ; si la suture est nécessaire, laisser agir le sérum antirabique quelque instants.</li> </ul>	
<b>MISES EN GARDE :</b> L'injection de sérum ne doit pas être répétée. Ne pas administrer par voie intraveineuse (risque de choc). Risque de réaction d'hypersensibilité : traitement à administrer en service spécialisé. Le sérum antirabique ne doit pas être administré avec la même seringue que celle utilisée pour injecter le vaccin rabique ni être administrée au même site anatomique que le vaccin rabique. Si possible le sérum antirabique doit être injecté contre latéralement aux sites d'administrations des immunoglobulines. Le traitement doit être complété par un traitement antitétanique si nécessaire et un traitement antibiotique afin de prévenir l'apparition d'infections autres que la rage.	
<b>CONTRE-INDICATION :</b> <b>Absolute :</b> Aucune contre-indication absolue en cas d'indication vitale. <b>Relative :</b> Hypersensibilité aux protéines hétérologues d'origine équine.	
<b>GROSSESSE ET ALLAITEMENT :</b> L'innocuité du produit au cours de la grossesse n'a pas été établie lors d'essais cliniques chez l'homme. Compte tenu du risque mortal lié à la rage, la grossesse n'est pas une contre-indication à l'instauration du traitement antirabique en post-exposition. Les immunoglobulines pouvant être excrétées dans le lait maternel, l'allaitement sera interrompu pendant le traitement.	
<b>EFFETS SECONDAIRES :</b> Hypotension artérielle, Dyspnée, Urticaire, Œdème de Quincke (Rare), Choc anaphylactique (Rare), Maladie sérique, Fièvre, Prurit, Erythème cutané, Adénopathie, Douleur articulaire.	
<b>CONSERVATION :</b> A l'abri de la lumière, à une température comprise entre +2° et +8°C. Ne pas congeler. Dans ces conditions la durée de conservation du sérum antirabique IPA est de 3 ans.	
<b>Institut Pasteur d'Algérie</b> Route du Petit Staouéli - Dely-Brahim - Alger	
Date de révision de la notice : Janvier 2013 [ 0305 0113 ]	

## Annexe 6 : Notice de l'immun sérum antirabique Butantan®



**INSTITUTO  
BUTANTAN**

SECRETARIA  
DE ESTADO  
DA SAÚDE



GOVERNO DO ESTADO  
DE SÃO PAULO

## SÉRUM ANTI-RABIQUE

---

**FORME FARMACEUTIQUE ET PRÉSENTATION**  
Le sérum anti-rabique est présenté sous forme de flacons de 5 mL, en solution injectable de la fraction F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobulines spécifiques et purifiées, obtenues à partir du plasma équin hyperimmunisé "corn virus fixe", échantillon PV, répliqué en culture cellulaire.

**UTILISATION PÉDIATRIQUE ET ADULTE**

**COMPOSITION**  
Chaque flacon de 5 mL contient:

- Fraction F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobulines équivalent au minimum à 1.000 Unités Internationales (neutralisation par sérum avec des souris)
- Phenol ..... 10 mg (maximum)
- Solution physiologique 0,85% q.s.p ..... 5 mL

**INFORMATION AU PATIENT**  
**LE SÉRUM ANTI-RABIQUE NE DOIT PAS ÊTRE LAISSÉ À LA PORTÉE DES ENFANTS.**  
Conserver le au réfrigérateur entre 2 °C et 8 °C. Ne pas le congeler. Le contenu du flacon doit être limpide et transparent. Ne pas l'utiliser en cas de turbidité ou précipitation.  
LA DATE LIMITE D'UTILISATION et le NUMÉRO DE SÉRIE sont indiqués sur l'emballage et sur le flacon.  
Dès l'ouverture du flacon, le sérum doit être utilisé immédiatement. Ne pas l'utiliser après la date limite d'utilisation.  
Une fois administré, l'effet du sérum commence immédiatement en retardant le début de la maladie dans les cas les plus graves. Il procure ainsi plus de temps au développement de l'immunité acquise par le vaccin. L'utilisation du SÉRUM ANTI-RABIQUE n'est pas contre-indiquée pendant la grossesse. Cependant le médecin doit être mis au courant de cette condition. Infiltrer dès que possible une partie du volume total du SÉRUM ANTI-RABIQUE sur la morsure. Le volume restant doit être toujours appliqué par voie intra-musculaire, sur les fesses, selon les doses prescrites (voir POSOLOGIE). Avant l'application du sérum, il est important de faire une analyse sur l'apparition de possibles effets indésirables comme effets anaphylactiques (voir EFFETS INDESIRABLES). Ne pas interrompre le traitement sans l'avis de votre médecin.  
LE SÉRUM ANTI-RABIQUE est efficace lorsqu'il est administré précocement et ainsi il doit être appliqué même après les repas ou ingestion de boissons alcoolisées. L'association du sérum avec d'autres médicaments n'est pas déconseillé.

**RECOMMANDATIONS**

- NE PAS ADMINISTRER DES BOISSONS ALCOOLISÉES;
- MAINTENIR LE PATIENT AU REPOS ET HYDRATE;
- NE PAS UTILISER CE MÉDICAMENT SANS L'AVIS DE VOTRE MÉDECIN. CELA PEUT ÊTRE DANGEREUX POUR VOTRE SANTÉ. EN CAS D'ACCIDENT APPELER LE PLUS VITE POSSIBLE UNE ASSISTANCE MÉDICALE.
- INFORMER VOTRE MÉDECIN EN CAS D'OCURRENCE D'EFFET INDESIRABLE.

**INFORMATIONS TECHNIQUES**

**INDICATION**  
Le SÉRUM ANTI-RABIQUE est indiqué surtout en cas de blessures importantes provoquées par la morsure de l'animal en question. La gravité potentielle de la blessure est liée à la richesse de terminaisons nerveuses existantes dans la région de la morsure (ou du lapement). Les morsures à la face, sur la tête, les mains et les pieds; des blessures multiples ou étendues; des blessures profondes; des lapements des muqueuses sont considérés graves. Dans de telles circonstances, l'administration du SÉRUM ANTI-RABIQUE dilate la période d'incubation de la maladie, ce qui permet un temps plus long pour l'installation de l'immunité active induite par le vaccin qui doit être appliqué simultanément. Le potentiel thérapeutique sera d'autant plus fort que l'administration du sérum dans les doses et conditions stipulées sera précoce.

**CONTRE-INDICATIONS**  
Pratiquement inexistante. Les patients avec des antécédents allergiques ou sensibles aux sérum d'origine équine l'application du SÉRUM ANTI-RABIQUE doit être suivie par une assistance médicale stricte.

**INTERACTIONS MÉDICAMENTEUSES**  
Aucun autre traitement concomitant à l'utilisation du SÉRUM ANTI-RABIQUE ne sera déconseillé. Cependant tout traitement doit être signalé au médecin.

**RÉACTIONS INDESIRABLES**

Puisqu'il s'agit d'un sérum hétérologue, il est possible l'apparition des réactions:

**a) Réactions précoces**

Elles ont une fréquence variable. Elles peuvent se dérouler pendant l'infusion du sérum et sur les premières 24 heures qui s'en suivent. Elles peuvent être du type (anaphylactique ou anaphylactoïde). Cela peut être grave et demander un suivi médical. Les patients déjà traités antérieurement avec des sérum équins peuvent présenter ces réactions plus fréquemment.

**Prévention des réactions**

1. Solliciter des renseignements sur le patient sur l'usage antérieur du sérum hétérologue (anti-tétanique, anti-rabique, antioïdique), et des problèmes allergiques d'origines diverses. Face à des affirmations positives, tenir compte du potentiel de réactions adverses et à l'administration des anti-histaminiques (antagonistes H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub>) avec 15 minutes d'antécédence de la dose du sérum recommandée.
2. Le test de sensibilité ne fait plus partie de la routine de traitement avec les sérums hétérologues, car il ne se montre pas efficace à la détection de la sensibilité du patient. Le test lui-même peut entraîner des réactions. Le temps mis à faire le test retarde le sérum thérapeutique.

**Traitement des réactions précoces**

Une fois la réaction installée, il faut interrompre la thérapie avec le sérum et initier son traitement. En cas d'urticaire généralisée, crise asthmatiforme, œdème de glotte et choc il faut procéder l'administration immédiate de l'adrénaline aqueuse 1:1.000, par voie sous-cutanée ou par voie musculaire, dose de 0,3 à 0,5 mL chez l'adulte et 0,01 mL/kg chez l'enfant, pouvant être répétée tous les 5 à 10 minutes, selon le besoin. En cas de crise asthmatiforme, il est encore recommandé l'utilisation de bronchodilatateurs par inhalateurs ou aminophylline par voie parentérale. Les corticostéroïdes et anti-histaminiques ont un rôle secondaire dans le contrôle de ces réactions, pouvant être également utilisés. Après le renvoi de la grille d'hypersensibilité, réinstaurer la sérumthérapie.

**b) Réactions tardives**

Elles sont en général bénignes et ont lieu entre 5 à 24 jours après l'administration du sérum. Elles sont les suivantes: fièvre, urticaire, arthralgie, adénomégalie, et, plus rarement, atteinte neurologique ou rénale. Cette réaction est également connue sous le nom de la Maladie du Sérum et elle est traitée avec l'administration des corticostéroïdes, analgésiques et anti-histaminiques.

**POSOLOGIE**

Appliquer le SÉRUM ANTI-RABIQUE aux doses prescrites le plus rapidement possible.

**DOSES ET VOIE D'ADMINISTRATION**

Administrer le SÉRUM ANTI-RABIQUE en dose unique de 40 UI/kg de poids, par voie intramusculaire, ne pas dépasser un total de 3.000 UI. Une partie de la dose recommandée doit être administrée autour des blessures provoquées par la morsure. Ce qui en reste doit être administré par voie intramusculaire (région des fesses) dans une région autre que celle du vaccin contre la rage. Dans l'impossibilité d'administrer le SÉRUM ANTI-RABIQUE au moment, la vaccination devra être initiée et le sérum devra être appliqué le plus vite possible, jusqu'au 7ème jour du début de la vaccination. Après cette période l'emploi du SÉRUM ANTI-RABIQUE n'est plus recommandé.

**RECOMMANDATIONS SPECIALES**

- L'AVERTIR IMMÉDIATEMENT LA BLESSURE PROVOQUÉE PAR LA MORSURE AVEC DE L'EAU COURANTE ET DU SAVON;
- DESINFECTER LA BLESSURE AVEC DES ANTISEPTIQUES (ex.: de la vase);
- IL NE CONVIENT PAS DE FAIRE SUTURÉ LES BLESSURES SAUF RECOMMANDATION DE SUTURE REPARATRICE;
- NE PAS UTILISER LA MEME SERINGUE POUR L'APPLICATION DU VACCIN ET DU SÉRUM;
- NE PAS APPLIQUER LE VACCIN ET LE SÉRUM SUR LA MEME RÉGION ANATOMIQUE;
- NE PAS DÉPASSER LES DOSES PRÉSCRITES DU SÉRUM.

**CONSERVATION**

Conserver entre 2 °C et 8 °C. NE PAS LE CONGELER.

**DATE LIMITE D'UTILISATION**

La date limite d'utilisation du sérum anti-rabique est de trois années à partir de la date de fabrication, lors que conservé entre 2 °C et 8 °C.

Número de Registro MS: 1.2234.0010  
FARMACÉUTICO RESPONSÁVEL  
Dra. Ivone Kazuko Yamaguchi  
CRF-SP n° 8057

INSTITUTO BUTANTAN  
Av. Vital Brasil, 1500 - Butantã  
CEP 05503-900 - São Paulo - Brasil  
C.N.P.J.: 01.621.944/0001-66  
Indústria Brasileira

Serviço de Atendimento ao Consumidor  
tel. (011) 3726-3816



Cód. Laetus: 15

## Annexe 7 : Notice de l'immun sérum antirabique Vinrab®

Pour l'utilisation de médecin agréé ou d'un laboratoire

## VINRAB 1000 U.I. 5 mL

**Antidrom contre la rage**

**Composition:**  
Chaque flacon contient:  
Fragments d'immunoglobulines équine rabique pas moins de 1000 U.I.  
Chélat. B.P.  $\leq$  0,25% v/v de conservateur  
Glycine B.P. 0,025 g/ml  
Chlorure de sodium B.P. 0,005 g/ml  
Eau pour injections B.P. q. s.

**Description:**  
VINRAB 1000 U.I. est une solution stérile non-pyrogénique qui s'administre par voie intramusculaire et qui contient des substances antitoxiques issues du plasma sanguin de chevaux sains qui ont été immunisés contre la rage par une vaccination. De plus, il contient l'agent antimicrobien Chélat.

**Indications thérapeutiques:**  
VINRAB 1000 U.I. procure une immunité passive contre la rage pour une période de la rage chez des patients risquant d'être exposés à la rage après avoir été en contact avec un animal étranger ou présumé enragé. Le sérum contre la rage ne constitue pas un traitement contre la rage et doit toujours être utilisé conjointement avec un vaccin contre la rage.

**Contre-indications:**  
Doit être utilisé avec une extrême vigilance chez les patients ayant déjà eu des symptômes allergiques ou une hypersensibilité au sérum de cheval.

**Avertissements spéciaux et précautions d'emploi:**  
Malgré le haut degré de purification du sérum, il est recommandé de réaliser un test cutané avant d'administrer le VINRAB 1000 U.I. Ce test consiste en une injection intradermique avec une dilution de 1-10 du VINRAB 1000 U.I. (0,1 mL) sur l'extériorité de l'avant bras afin d'obtenir une surface orange en forme de cercle (d'un diamètre de 10 mm). Une injection intradermique équivalente de solution saline physiologique est utilisée pour contrôler le résultat.

Les observations faites 15 minutes après l'injection intradermique sont considérées positives s'il y a un érythème (>6 mm), un œdème local ou une réaction systémique, et si le centre ne manifeste pas de telles réactions dermatiques. Les immunoglobulines de cheval purifiées contre la rage (le constituant actif du sérum contre la rage) ont été reconnues comme une alternative sûre et abordable aux immunoglobulines humaines contre la rage (bulletin OMS 1989, 67 (731-732)).

Un résultat de test positif n'est pas une contre-indication formelle à l'utilisation de la sérothérapie, mais doit être considéré comme un avertissement des risques encourus. Dans une telle situation, VINRAB 1000 U.I. doit être administré seulement après s'être assuré de la possibilité de résoudre le choc anaphylactique. Un test négatif n'est pas une garantie absolue de l'absence de réaction immédiate de type allergique.

**Interaction des traitements:**  
La prévention contre la rage après des risques de contamination nécessite une administration simultanée d'immunoglobulines contre la rage et d'un vaccin, qui doivent être administrés dans des parties différentes du corps, de façon contre-indifférenciable, afin de limiter les interférences. L'antidrom ne doit pas être administré avec la même seringue que le vaccin.

**Grossesse et lactation:**  
Dans le cadre d'une grossesse, l'utilisation du sérum contre la rage n'est établie comme sûre par les tribunaux médicaux. En considérant le risque vital associé à la rage, la grossesse n'est pas une contre-indication à l'administration du sérum contre la rage concomitante à une exposition au risque.

**Dosage et administration:**  
**Premier soins:**  
Un traitement local rapide de la morsure et des griffures présumées contaminées est important, quelque soit le temps écoulé depuis le contact. Les procédures de premiers soins recommandées sont un nettoyage rapide et minutieux de la blessure avec de l'eau et du savon, du détergent ou d'autres substances ayant un effet létal prouvé sur le virus de la rage. Le sérum contre la rage doit être injecté aussi tôt que possible après l'exposition au risque.

**Dosage et administration selon les catégories :**

CATÉGORIE	NATURE DU CONTACT AVEC L'ANIMAL ENRAGÉ OU PRÉSUMÉ ENRAGÉ, SAUVAGE, PORTÉUR PRÉSUMÉ DE VIRUS DE LA RAGE, OU AVEC UN ANIMAL SE POUSANT ÊTRE ENRAGÉ	TRAITEMENT RECOMMANDÉ
I	Antidrom et sérum antirabique post-exposition	Vaccin et sérum antirabique antipost-exposition
II	Morsures sur peau nue, piqûres et égratignures, ou lésions mineures, sans saignement, lésions superficielles	Administrer le vaccin immédiatement. Antidrom et traitement du rhabdomyosarcome en bonne santé au sein d'une période d'observation de 10 jours, ou l'antidrom, selon les conditions locales, est aussi requis pour la rage au moment d'évaluation de l'observation sérologique. Administrer un sérum antirabique en plus du vaccin antirabique ou pour les patients immunisés sérologiquement.
III	Morsures ou égratignures profondes, lésions ou lésions graves. Contourner les blessures et les lésions graves. L'antidrom et le sérum antirabique post-exposition	Administrer immédiatement un sérum antirabique au patient enrégé. Antidrom et traitement du rhabdomyosarcome en bonne santé en bonne santé en forme d'une période d'observation de 10 jours, ou l'antidrom, selon les conditions locales, est aussi requis pour la rage au moment d'évaluation de l'observation sérologique. Administrer un sérum antirabique en plus du vaccin antirabique ou pour les patients immunisés sérologiquement.

Pour la prévention contre la rage, un traitement combiné des immunoglobulines et du vaccin est recommandé.

La dose recommandée est de 40 U.I./kg du poids du patient. Si l'anatomie le permet, la dose devra être administrée autant que possible près des blessures. Le reste devra être administré en intramusculaire (sans la région gluteale) en une seule dose.

La première dose du vaccin devra être associée en même temps que les immunoglobulines, mais dans une partie différente du corps. Les enfants et les adultes reçoivent la même dose de 40 U.I./kg de leur poids. Si cela est indiqué, commencer un traitement antitoxique et administrer des médicaments antimicrobiens pour contrôler les infections autres que la rage.

**Effets secondaires:**  
Des réactions comme l'hypersensibilité peuvent se développer immédiatement ou avec un délai après l'administration du sérum contre la rage. Les réactions immédiates observées sont des réactions anaphylactiques avec de l'hypertension, de la dyspnée, de l'urticaire. Les réactions plus tardives consistent en une réaction inflammatoire, de la fièvre et des purpures, des abcès d'urticaire, de l'adénopathie et de l'arthralgie.

**Conservation:**  
À conserver entre 2°C and 8°C dans un frigidaire.  
NE PAS CONGELER. Tenir à l'abri de la lumière.

**Présentation:**  
Les ampoules contiennent 1000 U.I. (5 mL).

**Destruction:**  
Les restes de VINRAB 1000 U.I. et les ampoules usées doivent être détruits en tant qu'ordures biomédicales.


 Fabriqué par :  
**VIMS BIOPRODUCTS LIMITED**  
 Gindy (PVT), Thimphu (D), Box 22,  
 Khotang District, Nepal (DMS),  
 Andhra Pradesh, Inde  
 Code : 130202096

## Annexe 8 : Notice de l'immun sérum antirabique Favirab®

### Dénomination du médicament

**FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique**

### Encadré

**Veillez lire attentivement l'intégralité de cette notice avant d'utiliser ce médicament.**

- Gardez cette notice, vous pourriez avoir besoin de la relire.
- Si vous avez toute autre question, si vous avez un doute, demandez plus d'informations à votre médecin ou à votre pharmacien.
- Ce médicament vous a été personnellement prescrit. Ne le donnez jamais à quelqu'un d'autre, même en cas de symptômes identiques, cela pourrait lui être nocif.
- Si l'un des effets indésirables devient grave ou si vous remarquez un effet indésirable non mentionné dans cette notice, parlez-en à votre médecin ou à votre pharmacien.

### Sommaire notice

#### Dans cette notice :

1. QU'EST-CE QUE FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique ET DANS QUELS CAS EST-IL UTILISE ?
2. QUELLES SONT LES INFORMATIONS A CONNAITRE AVANT D'UTILISER FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique ?
3. COMMENT UTILISER FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique ?
4. QUELS SONT LES EFFETS INDESIRABLES EVENTUELS ?
5. COMMENT CONSERVER FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique ?
6. INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES

**1. QU'EST-CE QUE FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique ET DANS QUELS CAS EST-IL UTILISE ?**

#### **Classe pharmacothérapeutique**

C'est une immunoglobuline spécifique de la rage.

#### **Indications thérapeutiques**

FAVIRAB est indiqué dans la prophylaxie post-exposition de la rage chez les sujets pour lesquels on suspecte une exposition au virus de la rage, en particulier une exposition grave.

Favirab doit toujours être utilisé en association avec un vaccin rabique, selon les recommandations du Comité OMS d'experts de la rage, à l'unique exception des patients déjà immunisés par un vaccin rabique et pouvant présenter des documents attestant la vaccination par un vaccin produit par culture cellulaire (c'est-à-dire une vaccination pré-exposition complète dans l'année précédente, une injection de rappel consécutive dans les cinq années précédentes ou une prophylaxie post-exposition complète) Ces personnes peuvent recevoir le vaccin seul.

L'administration doit impérativement être effectuée sous contrôle médical (selon les recommandations locales) dans un centre anti-rabique.

## 2. QUELLES SONT LES INFORMATIONS A CONNAITRE AVANT D'UTILISER FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique ?

### Liste des informations nécessaires avant la prise du médicament

Sans objet.

### Contre-indications

#### Ne pas utiliser FAVIRAB:

Compte-tenu du risque mortel lié à la rage, il n'existe pas de contre-indication à l'administration d'immunoglobuline rabique.

### Précautions d'emploi ; mises en garde spéciales

#### Faites attention avec FAVIRAB

Ne pas administrer FAVIRAB par voie intraveineuse.

En cas d'antécédents allergiques connus aux protéines équines, préférer l'immunoglobuline humaine rabique.

FAVIRAB utilisé seul ne constitue pas un traitement antirabique.

Les injections multiples dans la blessure doivent être évitées.

FAVIRAB ne doit pas être administré avec la même seringue que celle utilisée pour injecter le vaccin rabique, ni administré au même site anatomique que le vaccin rabique.

En cas d'indisponibilité de l'immunoglobuline humaine rabique, l'administration de l'immunoglobuline équine rabique doit être faite sans délai mais sous surveillance médicale stricte, afin de prévenir et traiter un éventuel choc anaphylactique (voir rubrique 4).

Si des réactions allergiques ou anaphylactiques apparaissent, l'injection doit être arrêtée immédiatement. En cas de choc, le traitement de l'état de choc devra être instauré.

Compte tenu de la nature hétérologue de l'immunoglobuline équine rabique, le risque d'effets indésirables de type anaphylactique devra toujours être évalué:

- dans le but de détecter les personnes présensibilisées aux protéines hétérologues, un interrogatoire minutieux sur les antécédents allergiques du patient doit être effectué systématiquement en recherchant tout particulièrement l'existence d'injections antérieures de protéines hétérologues ayant provoqué (ou non) d'éventuelles réactions.
- les allergies au contact d'animaux, notamment les chevaux, voire les allergies alimentaires seront aussi recherchées.

Ce risque doit être considéré comme rare, étant donné le haut degré de purification de FAVIRAB.

Le traitement doit être complété par un traitement antitétanique si nécessaire et un traitement antibiotique afin de prévenir l'apparition d'infections autres que la rage.

### Interactions avec d'autres médicaments

#### Utilisation d'autres médicaments

FAVIRAB ne doit pas être mélangé avec d'autres vaccins ou produits médicinaux.

Les corticoïdes susceptibles d'atténuer la réponse immunitaire sont à éviter, en règle générale.

Si vous prenez ou avez pris récemment un autre médicament, y compris un médicament obtenu sans ordonnance, parlez-en à votre médecin ou à votre pharmacien.

### Interactions avec les aliments et les boissons

Sans objet.

### Interactions avec les produits de phytothérapie ou thérapies alternatives

Sans objet.

### Utilisation pendant la grossesse et l'allaitement

**Grossesse et allaitement**

L'innocuité du produit au cours de la grossesse n'a pas été établie lors d'essais cliniques chez l'homme. Compte tenu du risque mortel lié à la rage, la grossesse n'est pas une contre-indication à l'instauration du traitement antirabique en post-exposition.

Cependant, si le choix existe, les immunoglobulines humaines rabiques sont préférables.

Les immunoglobulines pouvant être excrétées dans le lait maternel, l'allaitement sera interrompu pendant le traitement.

Demandez conseil à votre médecin ou à votre pharmacien avant de prendre tout médicament.

**Sportifs**

Sans objet.

**Effets sur l'aptitude à conduire des véhicules ou à utiliser des machines****Conduite de véhicules et utilisation de machines**

Aucune étude sur la capacité à conduire des véhicules et à utiliser des machines n'a été réalisée.

**Liste des excipients à effet notoire****Liste des excipients à effet notoire:**

Sodium (chlorure). Ce médicament contient moins d'une millimole (ou 23 mg) de sodium par unité de prise.

**3. COMMENT UTILISER FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique ?****Instructions pour un bon usage**

L'administration doit impérativement être effectuée sous contrôle médical (selon les recommandations locales) dans un centre anti-rabique.

Le traitement doit être adapté selon le type de contact (voir Tableau 1) et le statut immunitaire du sujet.

Le Tableau 1 ci-dessous est un guide pour la prophylaxie post-exposition adapté du rapport TRS 931 de l'OMS, 2004.

**Tableau 1: Type de contact et d'exposition**

Catégories	Nature du contact	Nature de l'exposition	Traitement recommandé
I	Contact ou alimentation de l'animal. Léchage sur peau intacte.	Aucune	Aucun si une anamnèse fiable peut être obtenue.
II	Peau découverte mordillée. Griffures bénignes ou excoriations, sans saignement.	Mineure	Administrer le vaccin immédiatement. Arrêter le traitement si l'animal est en bonne santé après 10 jours d'observation ou si après euthanasie la recherche de la rage par les techniques de laboratoire appropriées est négative.
III	Morsure(s) ou griffure(s) simple ou multiples, ayant traversé la peau. Léchage sur peau abrasée. Contamination des muqueuses par la salive (léchage). Exposition à des chauves-souris.	Grave	Administrer immédiatement des immunoglobulines* et le vaccin rabique. Arrêter le traitement si l'animal est en bonne santé après 10 jours d'observation ou si après euthanasie la recherche de la rage par les techniques de laboratoire appropriées est négative.

\*Les immunoglobulines doivent être injectées par infiltration. En cas d'expositions multiples graves, et si cela est possible, l'immunoglobuline rabique humaine doit être utilisée (recommandations OMS TRS 931, 2004)

Pour la prévention de la rage en post-exposition, un traitement associant l'immunoglobuline équine rabique et le vaccin rabique est recommandé, bien que l'expérience indique que pour les expositions mineures (catégorie II) le vaccin seul pourrait suffire.

Le traitement local et rapide de toutes les plaies provoquées par morsure ou griffure est très important et doit être réalisé immédiatement après la morsure ou griffure.

#### Posologie, Mode et/ou voie(s) d'administration, Fréquence d'administration et Durée du traitement

##### Posologie

FAVIRAB doit être injecté aussi rapidement que possible après exposition.

La dose recommandée est de 40 UI/kg de poids corporel chez l'adulte et l'enfant.

Le calcul de la dose est basé sur une concentration de 200 UI/ml dans le flacon.

Lors de blessures multiples, le volume de la dose calculée de l'immunoglobuline équine rabique peut ne pas être suffisant pour infiltrer toutes les blessures. Dans ce cas, la dose recommandée de FAVIRAB peut être diluée au 1/2 ou au 1/3 dans une solution de NaCl à 9% afin d'obtenir un volume suffisant permettant l'infiltration de toutes les plaies.

En raison du risque d'interférence avec la production d'anticorps liée à la vaccination, il convient de ne pas augmenter la dose et de ne pas administrer de doses répétées d'immunoglobuline (même si l'instauration de la prophylaxie simultanée est retardée).

Respectez toujours la posologie indiquée par votre médecin. En cas de doute, consultez votre médecin ou votre pharmacien.

##### Mode d'administration

Infiltration autour et dans les blessures. Le surplus doit être administré lentement par voie intramusculaire.

Les premiers soins recommandés consistent à laver et à nettoyer immédiatement et abondamment pendant 15 minutes la plaie avec de l'eau et du savon, du détergent, de la Iodine povidone ou tout autre substance ayant une action létale prouvée sur le virus de la rage. Si du savon ou un autre agent antiviral n'est pas disponible, la plaie doit être lavée soigneusement et abondamment avec de l'eau.

Le maximum de la dose doit être infiltré autour et dans les blessures si cela est anatomiquement réalisable. Tout surplus doit être administré lentement par voie intramusculaire, en une seule injection, à un site anatomique distant de celui utilisé pour injecter le vaccin rabique. Si possible, le vaccin doit être injecté contre-latéralement aux sites d'administration de l'immunoglobuline.

L'infiltration des plaies dans certains sites anatomiques (extrémité des doigts) doit être réalisée avec précaution afin de prévenir une augmentation de pression dans le compartiment tissulaire (syndrome des loges).

La première dose de vaccin est injectée en même temps que l'immunoglobuline équine rabique. Dans le cas où lors de l'administration du vaccin rabique, l'immunoglobuline rabique équine ne serait pas disponible, elle peut être administrée jusqu'au 7<sup>ème</sup> ou 8<sup>ème</sup> jour après la première dose de vaccin. Passé ce délai, la réponse active due au vaccin rabique est censée s'être produite.

#### Symptômes et instructions en cas de surdosage

**Si vous avez pris plus de FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique que vous n'auriez dû:**

Si la posologie recommandée n'est pas strictement respectée (surdosage), il existe un risque d'interférence immunosuppressive avec le vaccin rabique.

#### Instructions en cas d'omission d'une ou de plusieurs doses

**Si vous oubliez d'utiliser FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique:**

L'immunoglobuline équine rabique doit être administrée même si l'instauration du traitement est retardée, quelle qu'en soit la raison, et quel que soit l'intervalle entre l'exposition au virus de la rage et le traitement. L'immunoglobuline équine rabique peut être administrée jusqu'au 7<sup>ème</sup> ou 8<sup>ème</sup> jour après la première dose de vaccin.

#### Risque de syndrome de sevrage

#### 4. QUELS SONT LES EFFETS INDESIRABLES EVENTUELS ?

##### Description des effets indésirables

Comme tous les médicaments, FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique est susceptible d'avoir des effets indésirables, bien que tout le monde n'y soit pas sujet.

**Trouble généraux et anomalies au site d'administration.**

**Effets indésirables très rares (c'est-à-dire moins de 1 patient sur dix mille)**

Les réactions de type allergiques immédiates ou retardées surviennent après utilisation de protéines hétérologues (non humaines).

- les réactions immédiates observées sont des réactions anaphylactoïdes avec hypotension, dyspnée (problème respiratoire), éruption ou urticaire. Dans de très rares cas, des réactions plus graves tel qu'un œdème de Quincke (gonflement soudain de la face et du cou d'origine allergique) ou un choc anaphylactique peuvent se produire.
- les réactions retardées comparables à la maladie sérique (maladie due à une réaction allergique) ou l'œdème angioneurotique décrits après administration de protéines hétérologues (non humaines) peuvent apparaître environ six jours après le début du traitement. Elles consistent en une réaction inflammatoire due à une activation du complément et à la formation de complexes immuns (réaction d'hypersensibilité de type III), parfois accompagnées de signes cliniques tels que fièvre, prurit, érythème (éruption) ou urticaire, adénopathie (augmentation de la taille des ganglions) et arthralgies (douleurs des articulations).

Si vous remarquez des effets indésirables non mentionnés dans cette notice, ou si certains effets indésirables deviennent graves, veuillez en informer votre médecin ou votre pharmacien.

#### 5. COMMENT CONSERVER FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique ?

Tenir hors de la portée et de la vue des enfants.

##### Date de péremption

Ne pas utiliser FAVIRAB après la date de péremption mentionnée sur la boîte.

##### Conditions de conservation

A conserver entre 2°C et 8°C (au réfrigérateur). Ne pas congeler.  
Protéger de la lumière

##### Si nécessaire, mises en garde contre certains signes visibles de détérioration

Les médicaments ne doivent pas être jetés au tout à l'égout ou avec les ordures ménagères. Demandez à votre pharmacien ce qu'il faut faire des médicaments inutilisés. Ces mesures permettront de protéger l'environnement.

#### 6. INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES

##### Liste complète des substances actives et des excipients

Que contient FAVIRAB, solution injectable, fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique ?

**La substance active est:**

Des fragments F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline équine rabique (200- 400 UI/ml).

**Les autres composants sont:**

Le polysorbate 80, le chlorure de sodium, l'eau pour préparations injectables, l'acide chlorhydrique concentré ou l'hydroxyde de sodium pour ajustement du pH entre 6,0 et 7,0.

##### Forme pharmaceutique et contenu

**Qu'est-ce que FAVIRAB et contenu de l'emballage extérieur ?**

FAVIRAB est une solution injectable en flacon de 5 ml – Boîte de 1 ou 10.

Toutes les présentations peuvent ne pas être commercialisées.

**Nom et adresse du titulaire de l'autorisation de mise sur le marché et du titulaire de l'autorisation de fabrication responsable de la libération des lots, si différent**

**Titulaire**

**SANOPI PASTEUR**  
2, AVENUE PONT PASTEUR  
69007 LYON  
FRANCE

**Exploitant**

**SANOPI PASTEUR msd s.N.C.**  
8 RUE JONAS SALK  
69007 LYON  
FRANCE

**Fabricant**

**SANOPI PASTEUR**  
ZONE INDUSTRIELLE D'INCARVILLE  
27100 VAL DE REUIL  
FRANCE

**Noms du médicament dans les Etats membres de l'Espace Economique Européen**

Sans objet.

**Date d'approbation de la notice**

La dernière date à laquelle cette notice a été approuvée est le {date}.

**AMM sous circonstances exceptionnelles**

Sans objet.

**Informations Internet**

Des informations détaillées sur ce médicament sont disponibles sur le site Internet de l'Afssaps (France).

**Informations réservées aux professionnels de santé**

Sans objet.

**Autres**

Sans objet.

**Annexe 9 : Réactifs**

**Préparation du tampon PBS**

NaCl .....	8g
KCl .....	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O .....	1,13g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O .....	0,076g

Compléter à 1L avec de l'eau distillée

**Solution de coloration au bleu de Coomassie**

Bleu de Coomassie à 5% .....	0,25g
Ethanol à 50% .....	250ml
Acide acétique à 10% .....	50ml
Eau distillée.....	200ml

**Solution de décoration**

Acide acétique à 10%.....	100ml
Ethanol à 50% .....	45ml
Eau distillée.....	730ml

## Annexe 10 : Certificat de contrôle qualité de l'agarose utilisée

LABORATORIOS CONDA, S.A.  
PRONADISA ®

C/ La Forja, 9  
28850 Torrejon de Ardoz  
(Madrid)

**QUALITY CONTROL CERTIFICATE**

Medium: EUROPEAN BACTERIOLOGICAL AGAR  
CAT N° 1800

LOT 670611      2015/07      QC DATE: 2011/07/30

We hereby certify that the above mentioned peptone has been approved by the Quality Control Laboratory.

**CHEMICAL AND PHYSICAL CONTROL**

Appearance: ..... Normal      Color: ..... Cream

Particle Size (A.S.T.M.)		1.5% SOLUTION	
		Before Autoclaving	After Autoclaving
Over sieve- 20		4.2	3.4
Over sieve- 40		7.33	6.45
Over sieve- 60	95%		
Moisture	8.78%	<b>COLORIMETRY</b>	
Ashes	2.76%	n m u 450	0.078      0.085
Arsenic Max.	3 p.p.m	Gel strength (Nikan)	960 g/cm <sup>2</sup> 1010 g/cm <sup>2</sup>
Lead Max.	5 p.p.m	Gel point	35°C
Mercury Max.	1 p.p.m	Melting point	90°C
Cadmium Max.	1 p.p.m		
Total heavy metals *	20 p.p.m		

Laboratory result: **Satisfactory**

Carmen Ramirez, QC Manager



**Annexe 11 : Résultats des tests IDR des différents vaccins testés : diamètres des anneaux de précipitations et valeurs antigéniques correspondantes**

<b>Numéro de la boîte</b>	<b>Vaccins Antirabiques</b>	<b>Diamètres des anneaux de précipitation (mm)</b>	<b>Valeurs antigéniques correspondantes</b>
1	S.75	12	1,00
	S.89	10	0,69
	S.86	10	0,69
	S.90	10	0,69
	S.81	09	0,56
	S.71	11	0,84
	S.107	10	0,69
	S.98	11	0,84
2	S.91	09	0,56
	S.76	10	0,69
	S.95	10	0,69
	S.123	10	0,69
	S.121	12	1,00
	S.101	12	1,00
	S.146	11	0,84
	S.87	09	0,56
3	S.142	09	0,56
	S.82	09	0,69
	S.70.B	10	0,69
	S.145	10	0,69
	S.114	11	1,00
	S.140	12	1,00
	S.135	11	0,84
	S.77	11	0,56
4	S.116	10	0,56
	S.119	12	0,69
	S.120	12	0,69
	S.136	11	0,69
	S.139	12	1,00
	S.72	11	1,00
	S.85	10	0,84
	S.92	09	0,56
5	S.88	09	0,56
	S.70.A	11	0,69
	S.73	11	0,69
	S.112	10	0,69
	S.78	11	1,00
	S.111	09	1,00
	S.147	10	0,84
	S.124	12	0,56

<b>6</b>	S.108	10	<b>0,69</b>
	S.138	11	<b>0,84</b>
	S.141	10	<b>0,69</b>
	S.129	10	<b>0,69</b>
	S.148	10	<b>0,69</b>
	S.93	11	<b>0,84</b>
	S.131	12	<b>1,00</b>
	S.134	11	<b>0,84</b>
<b>7</b>	S.132	11	<b>0,84</b>
	S.97	11	<b>0,84</b>
	S.126	11	<b>0,84</b>
	S.130	10	<b>0,69</b>
	S.79	10	<b>0,69</b>
	S.80	10	<b>0,69</b>
	S.106	09	<b>0,56</b>
	S.99	11	<b>0,84</b>
<b>8</b>	S.100	11	<b>0,84</b>
	S.102	10	<b>0,84</b>
	S.103	10	<b>0,84</b>
	S.104	10	<b>0,69</b>
	S.118	10	<b>0,69</b>
	S.125	11	<b>0,69</b>
	S.127	10	<b>0,56</b>
	S.133	10	<b>0,84</b>
<b>9</b>	S.94	12	<b>1,00</b>
	S.110	09	<b>0,56</b>
	S.117	10	<b>0,69</b>
	S.74	11	<b>0,84</b>
	S.115	11	<b>0,84</b>
	S.143	10	<b>0,69</b>
	S.144	09	<b>0,56</b>

## Annexe 12 : Liste des vaccins classés forts selon le test des NIH

Vaccins	Titre initial	DE <sub>50</sub>	V A	DL <sub>50</sub> réelle
S.120	10 <sup>-6,80</sup>	10 <sup>-1,12</sup>	<b>0.44</b>	<b>100 DL<sub>50</sub></b>
S.097	10 <sup>-6,60</sup>	10 <sup>-1,12</sup>	<b>0.52</b>	<b>63 DL<sub>50</sub></b>
S.119	10 <sup>-6,80</sup>	10 <sup>-1,26</sup>	<b>0.61</b>	<b>100 DL<sub>50</sub></b>
S.124	10 <sup>-6,40</sup>	10 <sup>-1,05</sup>	<b>0.61</b>	<b>50 DL<sub>50</sub></b>
S.131	10 <sup>-6,50</sup>	10 <sup>-1,19</sup>	<b>0.61</b>	<b>40 DL<sub>50</sub></b>
S.138	10 <sup>-6,50</sup>	10 <sup>-1,19</sup>	<b>0.61</b>	<b>&gt; 50 DL<sub>50</sub></b>
S.072	10 <sup>-6,60</sup>	10 <sup>-1,12</sup>	<b>0.71</b>	<b>50 DL<sub>50</sub></b>
S.095	10 <sup>-6,00</sup>	10 <sup>-1,47</sup>	<b>0.71</b>	<b>31 DL<sub>50</sub></b>
S.116	10 <sup>-5,00</sup>	10 <sup>-1,12</sup>	<b>0.71</b>	<b>40 DL<sub>50</sub></b>
S.130	10 <sup>-7,20</sup>	10 <sup>-1,26</sup>	<b>0.71</b>	<b>40 DL<sub>50</sub></b>
S.136	10 <sup>-7,10</sup>	10 <sup>-1,26</sup>	<b>0.71</b>	<b>&gt; 50 DL<sub>50</sub></b>
S.134	10 <sup>-6,90</sup>	10 <sup>-1,40</sup>	<b>0.83</b>	<b>31 DL<sub>50</sub></b>
S.077	10 <sup>-6,40</sup>	10 <sup>-1,61</sup>	<b>0.84</b>	<b>31 DL<sub>50</sub></b>
S.114	10 <sup>-5,90</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.84</b>	<b>40 DL<sub>50</sub></b>
S.123	10 <sup>-6,30</sup>	10 <sup>-1,19</sup>	<b>0.84</b>	<b>50 DL<sub>50</sub></b>
S.132	10 <sup>-6,90</sup>	10 <sup>-1,82</sup>	<b>0.84</b>	<b>31 DL<sub>50</sub></b>
S.139	10 <sup>-7,10</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.84</b>	<b>&gt; 50 DL<sub>50</sub></b>
S.140	10 <sup>-6,80</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.84</b>	<b>&gt; 50 DL<sub>50</sub></b>
S.121	10 <sup>-6,50</sup>	10 <sup>-1,26</sup>	<b>0.98</b>	<b>63 DL<sub>50</sub></b>
S.135	10 <sup>-6,40</sup>	10 <sup>-1,41</sup>	<b>0.98</b>	<b>31 DL<sub>50</sub></b>
S.126	10 <sup>-6,70</sup>	10 <sup>-2,03</sup>	<b>1.16</b>	<b>50 DL<sub>50</sub></b>
S.154	10 <sup>-7,00</sup>	10 <sup>-1,33</sup>	<b>0,71</b>	<b>50 DL<sub>50</sub></b>

## Liste des vaccins classés moyens selon le test des NIH

Vaccins	Titre initial	DE <sub>50</sub>	V A	DL <sub>50</sub> réelle
S.104	10 <sup>-5,50</sup>	10 <sup>-1,61</sup>	<b>0.61</b>	<b>20 DL<sub>50</sub></b>
S.108	10 <sup>-6,30</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.61</b>	<b>20 DL<sub>50</sub></b>
S.090	10 <sup>-6,00</sup>	10 <sup>-1,12</sup>	<b>0.32</b>	<b>25 DL<sub>50</sub></b>
S.118	10 <sup>-5,80</sup>	10 <sup>-1,33</sup>	<b>0.32</b>	<b>31 DL<sub>50</sub></b>
S.103	10 <sup>-6,00</sup>	10 <sup>-1,40</sup>	<b>0.37</b>	<b>20 DL<sub>50</sub></b>
S.141	10 <sup>-6,90</sup>	10 <sup>-1,51</sup>	<b>0.51</b>	<b>13 DL<sub>50</sub></b>
S.107	10 <sup>-6,40</sup>	10 <sup>-1,68</sup>	<b>0.52</b>	<b>20 DL<sub>50</sub></b>
S.117	10 <sup>-6,40</sup>	10 <sup>-1,54</sup>	<b>0.52</b>	<b>31 DL<sub>50</sub></b>
S.133	10 <sup>-6,80</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.52</b>	<b>31 DL<sub>50</sub></b>
S.070 B	10 <sup>-6,80</sup>	10 <sup>-1,12</sup>	<b>0.71</b>	<b>25 DL<sub>50</sub></b>
S.076	10 <sup>-6,50</sup>	10 <sup>-1,40</sup>	<b>0.71</b>	<b>20 DL<sub>50</sub></b>
S.079	10 <sup>-6,40</sup>	10 <sup>-1,68</sup>	<b>0.71</b>	<b>25 DL<sub>50</sub></b>
S.089	10 <sup>-5,70</sup>	10 <sup>-1,47</sup>	<b>0.71</b>	<b>25 DL<sub>50</sub></b>
S.093	10 <sup>-6,20</sup>	10 <sup>-2,17</sup>	<b>0.84</b>	<b>20 DL<sub>50</sub></b>
S.099	10 <sup>-6,00</sup>	10 <sup>-1,47</sup>	<b>0.84</b>	<b>20 DL<sub>50</sub></b>
S.100	10 <sup>-6,70</sup>	10 <sup>-1,47</sup>	<b>0.84</b>	<b>20 DL<sub>50</sub></b>
S.098	10 <sup>-6,50</sup>	10 <sup>-1,33</sup>	<b>0.84</b>	<b>20 DL<sub>50</sub></b>
S.075	10 <sup>-6,50</sup>	10 <sup>-1,54</sup>	<b>0.99</b>	<b>20 DL<sub>50</sub></b>
S.094	10 <sup>-6,10</sup>	10 <sup>-2,24</sup>	<b>0.99</b>	<b>20 DL<sub>50</sub></b>
S.101	10 <sup>-6,80</sup>	10 <sup>-1,40</sup>	<b>0.99</b>	<b>25 DL<sub>50</sub></b>
S.127	10 <sup>-7,20</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.61</b>	<b>15 DL<sub>50</sub></b>
S.129	10 <sup>-7,10</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.61</b>	<b>15 DL<sub>50</sub></b>
S.147	10 <sup>-7,00</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.71</b>	<b>16DL<sub>50</sub></b>
S.148	10 <sup>-6,80</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.71</b>	<b>16 DL<sub>50</sub></b>
S.145	10 <sup>-6,80</sup>	10 <sup>-2,03</sup>	<b>1.16</b>	<b>10 DL<sub>50</sub></b>
S.146	10 <sup>-6,50</sup>	10 <sup>-1,96</sup>	<b>1.16</b>	<b>16 DL<sub>50</sub></b>
S.074	10 <sup>-6,30</sup>	10 <sup>-1,53</sup>	<b>1.16</b>	<b>18 DL<sub>50</sub></b>
S.073	10 <sup>-6,50</sup>	10 <sup>-1,60</sup>	<b>1.36</b>	<b>18 DL<sub>50</sub></b>
S.078	10 <sup>-6,10</sup>	10 <sup>-1,47</sup>	<b>0.61</b>	<b>31 DL<sub>50</sub></b>
S.080	10 <sup>-6,50</sup>	10 <sup>-1,61</sup>	<b>0.61</b>	<b>25 DL<sub>50</sub></b>
S.102	10 <sup>-6,20</sup>	10 <sup>-1,19</sup>	<b>0.61</b>	<b>25 DL<sub>50</sub></b>
S.125	10 <sup>-6,90</sup>	10 <sup>-1,61</sup>	<b>0.44</b>	<b>50 DL<sub>50</sub></b>
S.071	10 <sup>-7,00</sup>	10 <sup>-0,98</sup>	<b>0.51</b>	<b>50 DL<sub>50</sub></b>
S.115	10 <sup>-5,20</sup>	10 <sup>-0,98</sup>	<b>0.52</b>	<b>40 DL<sub>50</sub></b>
S.070 A	10 <sup>-6,80</sup>	10 <sup>-1,19</sup>	<b>0.84</b>	<b>25 DL<sub>50</sub></b>
S.149	10 <sup>-6,90</sup>	10 <sup>-1,49</sup>	<b>0,71</b>	<b>25 DL<sub>50</sub></b>
S.151	10 <sup>-6,50</sup>	10 <sup>-1,54</sup>	<b>0.61</b>	<b>25 DL<sub>50</sub></b>
S.152	10 <sup>-6,80</sup>	10 <sup>-1,54</sup>	<b>0.61</b>	<b>25 DL<sub>50</sub></b>
S.153	10 <sup>-6,20</sup>	10 <sup>-1,05</sup>	<b>0.37</b>	<b>50 DL<sub>50</sub></b>

## Liste des vaccins classés faibles selon le test des NIH

Vaccins	Titre initial	DE <sub>50</sub>	V A	DL <sub>50</sub> réelle
S.106	10 <sup>-6,60</sup>	10 <sup>-1,19</sup>	<b>0.32</b>	<b>13 DL<sub>50</sub></b>
S.081	10 <sup>-6,30</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.37</b>	<b>13 DL<sub>50</sub></b>
S.087	10 <sup>-6,00</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.44</b>	<b>6 DL<sub>50</sub></b>
S.110	10 <sup>-6,40</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.52</b>	<b>12 DL<sub>50</sub></b>
S.111	10 <sup>-6,90</sup>	10 <sup>-1,61</sup>	<b>0.52</b>	<b>13 DL<sub>50</sub></b>
S.092	10 <sup>-7,00</sup>	10 <sup>-1,61</sup>	<b>0.61</b>	<b>8 DL<sub>50</sub></b>
S.142	10 <sup>-7,30</sup>	10 <sup>-1,61</sup>	<b>0.61</b>	<b>13 DL<sub>50</sub></b>
S.144	10 <sup>-7,10</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.61</b>	<b>10 DL<sub>50</sub></b>
S.082	10 <sup>-6,60</sup>	10 <sup>-2,03</sup>	<b>0.71</b>	<b>13 DL<sub>50</sub></b>
S.088	10 <sup>-6,30</sup>	10 <sup>-1,96</sup>	<b>0.71</b>	<b>6 DL<sub>50</sub></b>
S.091	10 <sup>-6,70</sup>	10 <sup>-1,68</sup>	<b>0.71</b>	<b>8 DL<sub>50</sub></b>
S.112	10 <sup>-6,80</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.71</b>	<b>13 DL<sub>50</sub></b>
S.143	10 <sup>-6,70</sup>	10 <sup>-1,82</sup>	<b>0.71</b>	<b>10 DL<sub>50</sub></b>
S.086	10 <sup>-6,00</sup>	10 <sup>-1,68</sup>	<b>0.84</b>	<b>6 DL<sub>50</sub></b>
S.085	10 <sup>-6,40</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0.98</b>	<b>6 DL<sub>50</sub></b>
S.150	10 <sup>-6,30</sup>	10 <sup>-1,75</sup>	<b>0,44</b>	<b>25DL<sub>50</sub></b>

**Annexe 13 : Liste des vaccins classés forts selon le test d'IDR**

<b>Vaccins</b>	<b>Valeurs Antigéniques</b>
S.75	<b>1,00</b>
S.71	<b>0,84</b>
S.98	<b>0,84</b>
S.121	<b>1,00</b>
S.101	<b>1,00</b>
S.146	<b>0,84</b>
S.114	<b>0,84</b>
S.140	<b>1,00</b>
S.135	<b>0,84</b>
S.77	<b>0,84</b>
S.119	<b>1,00</b>
S.120	<b>1,00</b>
S.136	<b>0,84</b>
S.139	<b>1,00</b>
S.72	<b>0,84</b>
S.70 A	<b>0,84</b>
S.73	<b>0,84</b>
S.124	<b>1,00</b>
S.78	<b>0,84</b>
S.138	<b>0,84</b>
S.93	<b>0,84</b>
S.131	<b>0,98</b>
S.134	<b>0,84</b>
S.132	<b>0,84</b>
S.97	<b>0,84</b>
S.126	<b>0,84</b>
S.99	<b>0,84</b>
S.100	<b>0,84</b>
S.125	<b>0,84</b>
S.94	<b>0,98</b>
S.74	<b>0,84</b>
S.115	<b>0,84</b>
S.149	<b>0,84</b>
S.154	<b>0,84</b>

**Liste des vaccins classés moyens selon le test d'IDR**

<b>Vaccins</b>	<b>Valeurs Antigéniques</b>
S.89	<b>0,69</b>
S.86	<b>0,69</b>
S.90	<b>0,69</b>
S.107	<b>0,69</b>
S.76	<b>0,69</b>
S.95	<b>0,69</b>
S.123	<b>0,69</b>
S.70 B	<b>0,69</b>
S.145	<b>0,69</b>
S.116	<b>0,69</b>
S.85	<b>0,69</b>
S.112	<b>0,69</b>
S.147	<b>0,69</b>
S.108	<b>0,69</b>
S.141	<b>0,69</b>
S.129	<b>0,69</b>
S.148	<b>0,69</b>
S.130	<b>0,69</b>
S.79	<b>0,69</b>
S.080	<b>0,69</b>
S.102	<b>0,69</b>
S.103	<b>0,69</b>
S.104	<b>0,69</b>
S.118	<b>0,69</b>
S.127	<b>0,69</b>
S.133	<b>0,69</b>
S.117	<b>0,69</b>
S.143	<b>0,69</b>
S.150	<b>0,69</b>
S.151	<b>0,69</b>
S.152	<b>0,69</b>
S.153	<b>0,69</b>

**Liste des vaccins classés faibles selon le test d'IDR**

<b>Vaccins</b>	<b>Valeurs Antigéniques</b>
S.81	<b>0,56</b>
S.91	<b>0,56</b>
S.87	<b>0,56</b>
S.142	<b>0,56</b>
S.82	<b>0,56</b>
S.92	<b>0,56</b>
S.88	<b>0,56</b>
S.111	<b>0,56</b>
S.106	<b>0,56</b>
S.110	<b>0,56</b>
S.144	<b>0,56</b>

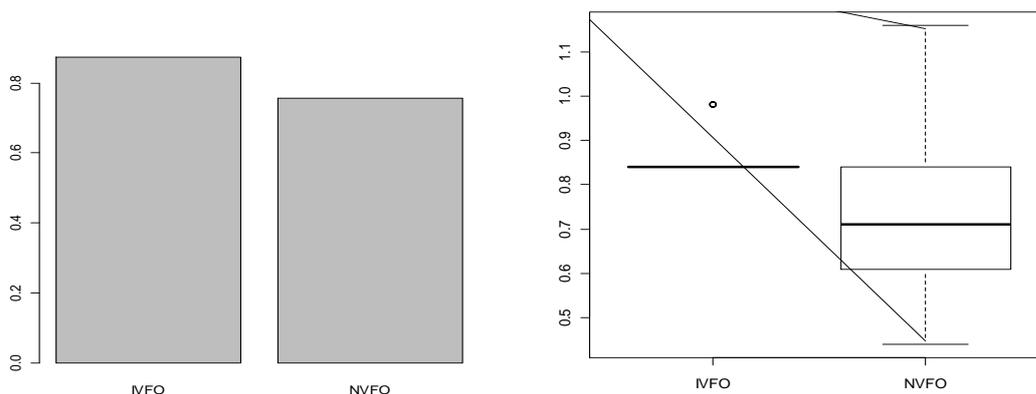
## Annexe 14 : Tests statistiques

✚ Comparaison des vaccins dans le test des NIH par le test de Newman-Keuls avec un intervalle de confiance de 95%

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
NIHFO vs NIHFA	0,132	2,871	2,395	0,015	Oui
NIHFO vs NIHFM	0,118	2,568	1,994	0,012	Oui
NIHFM vs NIHFA	0,014	0,303	1,994	0,763	Non

✚ Comparaison des vaccins classés forts selon les deux techniques

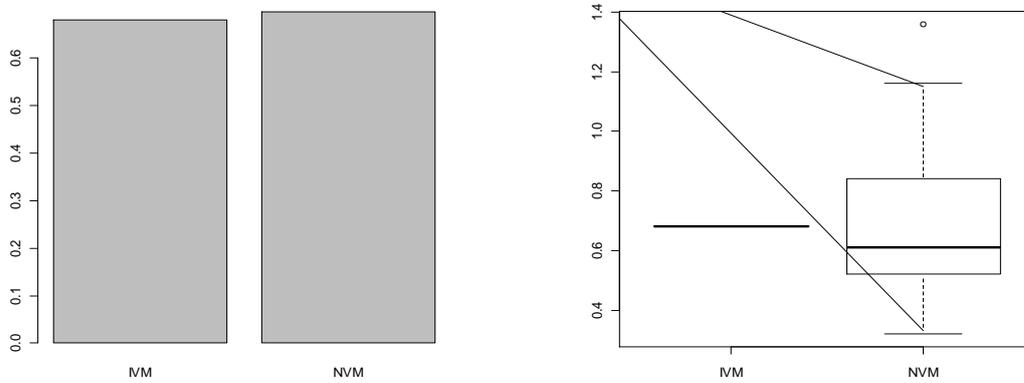
La comparaison des vaccins forts qui sont au nombre de 22 selon le test des NIH et de 34 selon le test d'IDR montre une différence hautement significative (W. test : p-value = 0,0001668).



Comparaison des vaccins classés forts selon les deux techniques

### Comparaison des vaccins classés moyens selon les deux techniques

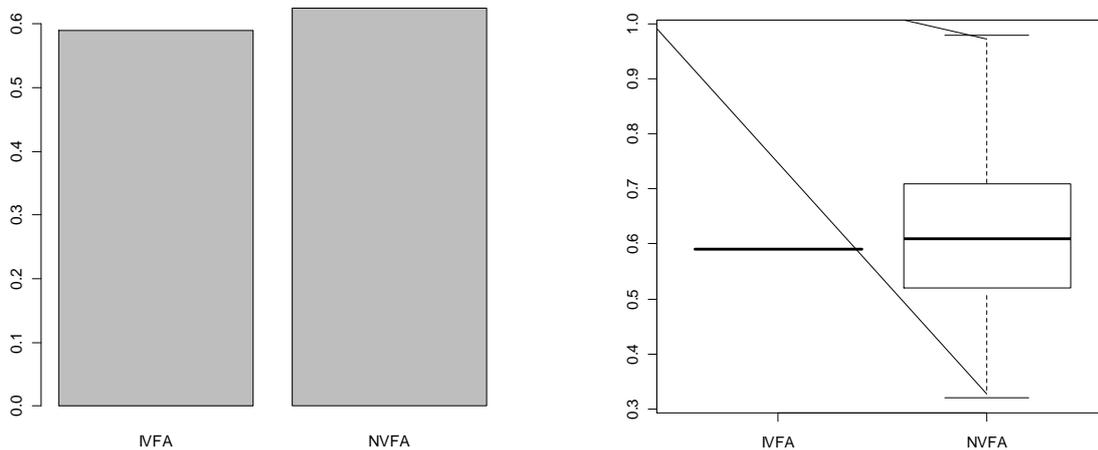
La comparaison des vaccins moyens qui sont au nombre de 40 selon le test des NIH et de 32 selon le test IDR ne montre aucune différence significative (W.test : p-value = 0,708).



### Comparaison des vaccins classés moyens selon les deux techniques

### Comparaison des vaccins classés faibles selon les deux techniques

La comparaison des vaccins faibles qui sont au nombre de 15 selon le test des NIH et de 11 selon le test IDR ne montre aucune différence significative (W.test : p-value = 0,1432).



### Comparaison des vaccins classés faibles selon les deux techniques

## **Résumé**

La technique d'immunodiffusion radiale (IDR) est l'une des méthodes *in-vitro* qui commence à se généraliser pour le contrôle des vaccins antirabiques inactivés *in process* et sur le produit fini. Dans cette étude, on se propose de mettre en place cette technique, au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie et de l'appliquer au contrôle de l'activité des vaccins antirabiques tissulaires inactivés. Une étude comparative des résultats obtenus a été réalisée avec le test des National Institutes of Health (NIH), test de référence à l'IPA, afin de mieux définir l'utilisation de cette technique.

Notre étude a porté sur soixante-dix-sept vaccins antirabiques tissulaires inactivés produits avec la souche virale Louis Pasteur Saigon (LPS). Pour les tests d'IDR, nous avons utilisé l'immun sérum hétérologue purifié IPA, qui est intégré dans la gélose à une concentration de 15µg/ml.

Les résultats obtenus par les deux techniques ont permis la classification des vaccins selon leurs valeurs antigéniques en 3 catégories (vaccins forts, moyens et faibles). La classification des vaccins selon les résultats de l'IDR a donné 44% de vaccins forts, 42% de vaccins moyens et 14% de vaccins faibles. À partir des résultats du test des NIH, la classification a donné 29% de vaccins forts, 52% de vaccins moyens et 19% de vaccins faibles. La comparaison des vaccins par paire entre les deux techniques NIH et IDR par la méthode d'Holm fait ressortir qu'il n'existe aucune différence significative entre les vaccins moyens et faibles des deux techniques, par contre une différence significative est observée entre les vaccins forts des deux techniques.

La fiabilité des résultats observés nous permet de suggérer la technique IDR dans le contrôle de l'activité des vaccins antirabiques tissulaires inactivés, ou du moins pour prédire les résultats du test des NIH, car peu coûteuse et fiable elle permet d'avoir une idée sur l'activité des vaccins en un temps très court, (96h maximum).

**Mots clés:** vaccin antirabique tissulaire inactivé, valeur antigénique, IDR, NIH

## **Abstract**

The radial immunodiffusion technique (RID) is one of the *in-vitro* methods which is beginning to become generalized for the control of rabies vaccines inactivated during production and on the finished product. In this study, we propose to implement this technique, at the Pasteur Institute of Algeria and apply it to control the activity of inactivated tissue rabies vaccines. A comparative study of the results was conducted with the test of the National Institutes of Health (NIH), the reference test to IPA, to better define the use of this technique.

Our studies is based on seventy seven inactivated tissue rabies vaccines, produced with the viral strain Louis Pasteur Saigon (LPS). For RID tests, we used a purified heterologous immune serum IPA, which is incorporated into the agar at a concentration of 15µg/ml.

The results obtained by the two techniques have been classified according to their antigenic values into 3 categories (strong vaccines, medium and low). The classification of vaccines according to the results of the RID gave 44% strong vaccines, 42% means vaccines and 14% of low vaccine. From the test results of NIH, the classification gave 29% strong vaccines, 52% means vaccines and 19% low vaccines. The vaccines comparison by pair between the two techniques NIH and RID by the Holm method revealed that there was no significant difference between the means vaccines and the lower vaccines for the two techniques. A significant difference is observed between the strong vaccines in the two techniques.

The reliability of the results obtained allow us to suggest the RID technique in controlling the activity of tissue inactivated rabies vaccines, or at least to predict the test results of NIH, because inexpensive and reliable it allows to have an idea about vaccine potency in a very short time (96 hours maximum).

**Keywords:** rabies tissular inactivated vaccine, antigenic value, RID, NIH.

## **ملخص:**

تقنية الانتشار المناعي الشعاعي (IDR) هي من إحدى الطرق الاصطناعية التي بدأت تتعمم لمراقبة نشاط لقاحات داء الكلب المعطلة خلال الإنتاج و على المنتج النهائي. في هذه الدراسة نقتراح تنفيذ هذه التقنية في معهد باستور بالجزائر وتطبيقها لمراقبة نشاط لقاحات داء الكلب النسيجي المعطل. تمت مقارنة النتائج المحصل عليها مع نتائج اختبار المعاهد الوطنية للصحة (NIH)، الاختبار المرجعي في معهد باستور بالجزائر وهذا لتقييم أفضل لاستخدام تقنية IDR.

تمت الدراسة على سبعة و سبعون دفعة من لقاحات داء الكلب المعطلة المنتوجه بسلالة الفيروسية لوييس باستور سايجون (LPS) بالنسبة لتقنية IDR تم استخدام المصل المناعي المنقى المنتج في معهد باستور بالجزائر، تم إدماجها في الأغار بتركيز 15µg/ml.

عبر النتائج المحصل عليها تم تصنيف اللقاحات حسب القيم الأنتيجينية إلى ثلاث فئات ( اللقاحات القوية، المتوسطة و الضعيفة). أعطى تصنيف اللقاحات حسب نتائج IDR: 44% من اللقاحات القوية، 42% من اللقاحات المتوسطة و 14% من اللقاحات الضعيفة. أما بالنسبة إلى نتائج اختبار NIH فالتصنيف أعطى 29% من من اللقاحات القوية، 52% من اللقاحات المتوسطة و 19% من اللقاحات الضعيفة. كشفت المقارنة بين التقنيتين NIH و IDR بطريقة Holm أنه لا يوجد فرق بين اللقاحات المتوسطة و الضعيفة بين التقنيتين، بينما يوجد فرق بين اللقاحات القوية بين التقنيتين.

موثوقية النتائج المحصل عليها تسمح لنا أن نقترح تقنية IDR لمراقبة نشاط لقاحات داء الكلب المعطلة، أو على الأقل لتنبؤ نتائج اختبار NIH لأن هذه التقنية غير مكلفة و موثوقة وتعطي فكرة عن فعالية اللقاحات في وقت قصير جدا (96 ساعة كأقصى حد).

**الكلمات الدالة:** لقاح داء الكلب النسيجي المعطل، القيمة الأنتيجينية، IDR، NIH.