

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE-ALGER

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة - الجزائر

PROJET DE RECHERCHE

*En vue de l'obtention*

DU DIPLOME DE MAGISTERE EN SCIENCES VETERINAIRES

*Pour l'option : « Zoonoses infectieuses-Diagnostic et thérapeutique »*

Thème

***Etude de la thermostabilité du virus rabique (ERA/SAD) en  
milieux stabilisants***

Présenté par : Melle Faïza BELAKEHAL

Soutenu publiquement le : 24/11/2011

**Proposé et encadré par :**

Mr le Dr BRAHIMI. M (Maître de recherche, IPA-Alger)

**Devant le jury composé de :**

**Président** : Mr HAMDI. TM (Maître de conférences, ENSV-Alger)

**Examineur** : Mme HAFSI. F (Chargée de cours, ENSV-Alger)

**Examineur** : Melle BOUKHORS. KT (Maître de conférences, ENSV-Alger)

**Examineur** : Melle BENMAHDI. MH (Professeur, ENSV-Alger)

Année universitaire 2010-2011

## Remerciements

Je remercie DIEU le tout puissant de m'avoir donné la force et le courage pour pouvoir participer à l'élaboration de ce travail et faire face aux épreuves les plus dures de la vie estudiantine. Témoignage ému, de profonde gratitude, d'extrême reconnaissance et de respect, enchaîné d'un éblouissement mystique à celui qui m'a tracé et illuminé le chemin à poursuivre, m'a formé et transmis des valeurs, mon très cher promoteur et directeur de thèse mon modèle de sagesse de rigueur et de persévérance, si adorablement plein de grâce tendre, un être imaginant le monde en fait partie, des travaux digne d'un Mythe de la recherche scientifique, un grand Monsieur et un grand Maître, vers l'intérieur médite le génie, s'élève la bonté, la splendeur, la pureté et la beauté de l'âme, fusionne la sonorité d'un nom divin : **Mr le Dr Mahfoud BRAHIMI** Maître de recherche et chef du service rage : Production de Vaccins et Sérum Antirabique - Institut Pasteur d'Algérie. A qui je dois tout ce travail, du début à la fin. Ma chance a été de pouvoir effectuer ma thèse sous votre direction, je remercie DIEU pour cette chance.

En fait, les mots n'existent pas pour décrire la personne du **Dr BRAHIMI**, je suis vraiment impressionnée et fascinée par votre savoir faire, votre façon de voir et d'expliquer les choses de manière si douce et agréable, par vos qualités humaines, votre générosité et compétence, et surtout par votre noblesse, votre intelligence, curiosité, charisme et virtuosité, votre désir profond d'initier le monde entier à l'extrême finesse de la science, avec un amour inestimable pour la recherche. Je remercie **Mr le Dr BRAHIMI** de m'avoir accueilli si chaleureusement et accepté humblement de partager ce projet avec moi au sein de son laboratoire, de m'avoir initié à la recherche. J'ai découvert le monde de la virologie, de la culture cellulaire et du vaccin grâce à vous. Vous avez été ma source d'inspiration pour la rédaction de ce document. Vous avez pris le soin de bien m'apprendre les bonnes pratiques de laboratoire, geste par geste et c'était vraiment formidable ! Vous avez tous fait pour que je puisse travail dans les meilleures conditions morales, je vous remercie du fond du cœur. Votre passion pour la science, est une vraie chance pour nous tous. L'encadrement et l'intérêt que vous m'avez prêté, à moi et à tous vos étudiants est incroyable, je vous dit mille et mille merci pour le temps « fou » que vous m'avez consacré, pour les innombrables séances de travail si riches et émouvantes, pleines de découvertes, merci pour tous les conseils précieux de la vie active, pour vos encouragements incessants, pour votre patience envers moi, merci pour l'écoute que vous m'avez prêté ainsi que pour la grande confiance que vous m'avez accordé.

J'implore DIEU de vous envelopper de sa lumière, sa Miséricorde, d'un bonheur suprême, vous protège, vous bénisse, vous procure la santé, la joie, la paix et la prospérité.

Votre nom sera gravé dans ma mémoire à jamais.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus distingués à Mr le Professeur TAZIR M. (Directeur de l'IPA), d'avoir accepté ma formation au sein de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Nos vifs remerciements iront à notre jury de thèse :

Dr HAMDI TM. (ENSV), pour le très grand honneur qu'il nous a fait en acceptant la présidence de notre jury et porter son appréciation sur ce travail.

Dr HAFSI F. (ENSV), d'avoir accepté très aimablement de lire et d'évaluer ce travail, qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de notre profond respect.

Nos sincères remerciements au Dr BOUKHORS KT. (ENSV) d'avoir été compréhensive, si gentille et surtout si loyale, vous avez vraiment contribué à la continuation de ce travail.

Au Pr BENMAHDI MH. (ENSV), d'avoir accepté de faire partie de notre jury de thèse.

Mes remerciements, compliments et hommages au personnel du laboratoire du service rage (IPA-Kouba) avec qui j'ai passé une année inoubliable en particulier : Mr le Dr ISSAD M. : pour votre présence, pour votre sympathie et soutien moral quotidien, Mme le Dr HALLAB A. : je ne saurais comment te remercier, tu m'a aidé dans les moments les plus difficile, je te souhaite beaucoup de succès, à Mr KHADIR M. : Mouloud tu es brillant et talentueux, merci pour ton aide énorme, tes encouragements et ta bonne humeur légendaire, Melle BAHBOU S. pour sa gentillesse et sa délicate attention. Merci de m'avoir si bien accueilli au sein de votre groupement. A Melle AZIZI S. de m'avoir soutenu, Mohammed de m'avoir aidé à faire mes titrages ainsi qu'a Ami Chaabane, avec qui j'ai passé des moments très agréables dans la salle de contrôle.

Hommage respectueux, vif et distingué à Mme le Professeur HAMMOUDI-TRIKI D. (USTHB), que je remercie infiniment pour son indulgente bienveillance, d'avoir accepté d'apporter ses corrections et son avis si précieux à ce document.

Je voudrais présenter des remerciements chaleureux et très particuliers à Mr le Dr BRAHIMI Zakaria A. de m'avoir toujours encouragé durant tout mon cursus universitaire. Je salut la bonté et la générosité du grand sage que tu es, tu a la pédagogie, la noblesse le charisme et l'humanisme de ton papa, je suis sure que tu arriveras un jour à continuer ces recherches avec brio, je compte sur toi pour que tu prennes sa place.

Je remercie vivement Mme ZENIA S. (ENSV) de m'avoir guidé dans le traitement statistique des résultats. Grand remerciements au personnel de la bibliothèque de l'ENSV: Hamid, Mebarka, Meriem, Wassila, Yacine, Djamila, Nassima, Tchikou(Fathi), Rachid, Fatiha, Zakia, Younes.

A tous ceux qui m'ont respecté, cru en moi et défendu mes idées, en particulier Melle BENATALLAH A. (ENSV). Je suis sincèrement désolée pour les bébés souriceaux qui ont été inoculés.....mais je suis contente de l'ampleur que peut prendre ce travail.....

## Dédicaces

Je dédie ce modeste travail, à mes très chers parents FADILA et HAMID, pour le bonheur qu'ils me prodiguent. A ma mère qui m'a entourée de son amour et de son affection, depuis mon enfance tu m'as toujours encouragée à aller de l'avant dans les études, à mon père qui a donné de lui-même pour nous instruire. Avec toute ma tendresse.

Que DIEU vous protège et vous garde tous près de moi.

A mes sœurs et à mon frère, témoignage de la profonde affection qui nous unit.

Je dédie ce travail à mon coach, l'éminent Mr le Dr Mahfoud BRAHIMI qui a beaucoup cru en moi ! et attendu à ce que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que les grâces du ciel soient avec vous.

A mes tantes : Saliha et Zakia, pour le soutien et l'attention que vous me prêtez, surtout tata Saliha qui a toujours été à mes cotés.

A toute ma famille, mes proches et mes amies.

A tous les bons moments que j'ai vécu durant tous mon cursus universitaire à l'ENSV.

Faïza BELAKEHAL

### Résumé :

La thermostabilité du virus rabique à été étudiée en soumettant la souche ERA produite sur cellules Vero à un vieillissement accéléré (7j à 37°C) en présence d'agents stabilisants.

L'analyse des résultats obtenus par la méthode de titrage in vivo (inoculation du virus rabique à des souriceaux à la mamelle âgés de 3 à 4j) a révélé que : le virus rabique ERA/Vero sans stabilisants se conserve bien à -20°C ou à -70°C, assez bien à +4°C, mais qu'il est sensible aux températures supérieures de 25°C et 37°C. Malgré sa fragilité et sa sensibilité aux températures élevées, le virus de la rage ERA/Vero mis à 37°C pendant 7j est retrouvé après analyse à un titre jugé acceptable. Dans les conditions de la pratique, les campagnes de vaccinations peuvent se faire de façon moins contraignante liée à la chaîne du froid, puisque la souche de virus rabique ERA/Vero peut résister et se maintenir à 37°C.

Mis à part le PBS et le saccharose à 2% véhiculé par le tampon ENDERS, tout les autres milieux utilisés au cours de cet étude : tampon ENDERS, le sorbitol à 1% véhiculé par le tampon ENDERS, le sorbitol à 4% véhiculé par le tampon PBS, le sorbitol à 4% véhiculé par l'eau distillée, ont donné un effet stabilisant sur le virus de la rage ERA/Vero après 7j d'incubation à 37°C.

La formulation qui a donné le meilleur effet stabilisant sur le virus de la rage étant celle du sorbitol à 4% véhiculé par le tampon PBS. Seul le saccharose s'est révélé inefficace, son utilisation à la concentration de 2% véhiculé par le tampon ENDERS n'a pas donnée un effet stabilisant sur le virus rabique, voir même un effet inverse c'est-à-dire néfaste sur le virus de la rage.

La solution de sorbitol à 4% véhiculé par le tampon PBS peut constituer une formulation idéale, adéquate et économique pour être incorporée dans les préparations vaccinales, afin d'aboutir à la production d'un vaccin antirabique thermostable et plus commode notamment dans les conditions drastiques de la pratique. Par ailleurs, le virus rabique s'est révélé stable en présence du tampon ENDERS seul sans incorporation de sorbitol ou de saccharose, ce qui pourrait constituer à lui seul un bon stabilisant pour le vaccin antirabique.

Mots clés : Virus rabique, stabilisants, thermostabilité, vaccin antirabique.

## **Summary :**

The thermostability of rabies virus has been studied by subjecting the ERA strain produced on Vero cells to an accelerated ageing (37°C for 7days) in the presence of stabilizing agents.

The analysis of the results obtained by the method of titration in vivo (inoculation of rabies virus to the old of 3 with 4 days suckling-mouse) has to reveal that : the rabies virus ERA/Vero without stabilizers is preserved well at -20°C or -70°C, rather well with +4°C, but that it is sensitive to the higher temperatures of 25°C and of 37°C. In spite of its brittleness and its sensitivity to the high temperatures, the rabies virus ERA/Vero put with 37°C during 7j is found after analysis with a titer considered to be acceptable. Under the conditions of the practice, the partners of vaccinations can be done in a less constraining way related to the cold chain, since the rabies virus strain ERA/Vero can resist and be maintained with 37°C.

With share the PBS and sucrose with 2% conveyed by the ENDERS buffer, all other mediums used during this study: ENDERS buffer, the sorbitol with 1% conveyed by ENDERS buffer, the sorbitol with 4% conveyed by PBS buffer, the sorbitol with 4% conveyed by distilled water, gave an effect stabilizing on the rabies virus ERA/Vero after 7days of incubation to 37°C.

The formulation which gave the best stabilizing effect on the rabies virus being that of the sorbitol with 4% conveyed by PBS buffer. Only the sucrose appeared ineffective, its use with the concentration of 2% conveyed by ENDERS buffer did not give a stabilizing effect on the rabies virus, to even see has to involve an opposite effect or harmful on the rabies virus.

The solution of sorbitol with 4% conveyed by PBS buffer can constitute an ideal, adequate and economic formulation to be built-in the vaccine preparations, in order to lead to the production of a thermostable and more convenient rabies vaccine, in particular under the drastic conditions of the practice. In addition, rabies virus appeared stable in the presence of ENDERS buffer alone without incorporation of sorbitol or sucrose, which could constitute with him only a good stabilizing for the rabies vaccine, without having to make recourse to the addition of other products.

**Keywords :** Rabies virus, stabilizer, thermostability, rabies vaccine.

## ملخص :

لقد تم دراسة استقرار فيروس الكلب في الحرارة و ذلك بإخضاع السلالة الفيروسيّة ERA الناتجة عن الخلايا Vero لاختبار الاستقرار المتسارع في الحرارة (37°C لمدة 7 أيام) في وجود المثبتات. كشف تحليل النتائج التي حصل عليها بأسلوب المعايرة في الجسم الحي (إعطاء الفئران الرضيعة التي تتراوح أعمارها بين 3 و 4 أيام فيروس داء الكلب) ما يلي : فيروس الكلب Vero/ERA دون مثبتات يخزن جيدا في درجات الحرارة 20°C- أو في 70°C- ، بطريقة جيدة إلى حد ما في 4°C+ لكنه حساس لدرجات الحرارة المرتفعة 25°C و 37°C. على الرغم من هشاشته وحساسيته لدرجات الحرارة المرتفعة، تم العثور على فيروس الكلب Vero/ERA الموضوع في 37°C لمدة 7 أيام بعد التحليل و بتركيز مقبول. في ظل ظروف ممارسة حملات التلقيح، يمكن لهذه العمليات أن تتم بدون التقييد المتعلق بسلسلة التبريد، بما أن السلالة الفيروسيّة Vero/ERA لداء الكلب يمكن أن تصمد وتبقى في 37°C.

بصرف النظر عن محلول PBS و السكروز 2% المحضر بمحلول ENDERS، كل المثبتات الأخرى المستخدمة في هذه الدراسة : محلول ENDERS، السوربيتول 1% المحضر بمحلول ENDERS، السوربيتول 4% المحضر بمحلول PBS و السوربيتول 4% المحضر بواسطة الماء المقطر، أظهرت استقرار فيروس الكلب Vero/ERA لمدة 7 أيام في 37°C. الصياغة التي أعطت أفضل أثر على استقرار فيروس الكلب هي السوربيتول 4% المحضر بمحلول PBS. وحده السكروز غير فعال، استخدامه بتركيز 2% بمحلول ENDERS لم يؤدي إلى استقرار فيروس الكلب، أو حتى أدى إلى تأثير معاكس أو سلبي على فيروس الكلب. السوربيتول بتركيز 4% المحضر بمحلول PBS يشكل صيغة مثالية مناسبة واقتصادية لإدراجها في الأعمال التحضيرية للقاح، من أجل تحقيق إنتاج لقاح ضد داء الكلب مستقر في الحرارة و أسهل استخداما خاصة في الظروف القاسية لممارسة حملات التلقيح . بالإضافة إلى ذلك، فيروس داء الكلب مستقر في وجود محلول ENDERS لوحده بدون إضافة السوربيتول أو السكروز، مما قد يشكل بحد ذاته مثبت جيد للقاح داء الكلب.

الكلمات الرئيسية : فيروس الكلب، مثبتات، الاستقرار في الحرارة، لقاح داء الكلب

**Liste des abréviations**

<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARN :</b>	Acide ribonucléique
<b>ARN<sub>m</sub> :</b>	ARN messenger
<b>BHK-21:</b>	Baby Hamster Kidney (cellules de rein de jeune hamster)
<b>BM-Sr2 :</b>	Tryptose phosphate broth-fetal calf serum 2% (Bouillon Tryptose phosphate-Sérum de veau fœtal 2%)
<b>CD4 :</b>	Cluster de différenciation 4
<b>CD8 :</b>	Cluster de différenciation 8
<b>CVS :</b>	Souche rabique : Challenge Virus Standard
<b>DL<sub>50</sub> :</b>	Dose létale de 50% des animaux
<b>DMEM :</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Milieu Minimum Essentiel d'Eagle modifié par Dulbecco)
<b>ECP :</b>	Effet cytopathogène
<b>ED :</b>	Eau distillée
<b>EDTA :</b>	Ethylène Diamine Tétra-Acétate
<b>ELISA :</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>ERA :</b>	Souche rabique : Evelyn Rokitnicki Abelseth
<b>Fig :</b>	Figure
<b>HBSS :</b>	Solution Saline Equilibrée de Hanks
<b>IPA :</b>	Institut Pasteur d'Algérie
<b>IPK :</b>	Institut Pasteur d'Algérie-Annexe de Kouba
<b>Kb :</b>	Kilobase
<b>LCR :</b>	Liquide céphalorachidien
<b>Log<sub>10</sub> :</b>	Logarithme de 10
<b>LPS :</b>	Souche rabique : Louis Pasteur Saigon
<b>MEM-0,1BSA :</b>	Minimal Essential Medium-0,1% Bovine Sera Albumin (Milieu Minimum Essentiel-0,1% Sérum albumine bovine)
<b>ml :</b>	Millilitre
<b>MMR :</b>	Measles Mumps Rubella (Polio Rougeole Rubéole)
<b>MRC-5 :</b>	Cellules diploïdes pulmonaires de fœtus humain avorté
<b>NIH :</b>	National Institute of Health

<b>NiL-2 :</b>	Fibroblastes de rein de hamster
<b>NK :</b>	Natural Killer (Cellules tueuses)
<b>nm :</b>	Nanomètre
<b>NTE :</b>	NaCl-Tris-EDTA
<b>OIE :</b>	Office Internationale des Epizooties
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PBS :</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PCECV:</b>	Purified Chick Embryo Cell Vaccine
<b>PCR :</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDEV:</b>	Purified Duck Embryo Vaccine
<b>PFC :</b>	Produit Fini Conditionné
<b>pH :</b>	Potentiel hydrogène
<b>P-L polymérase :</b>	l'ARN polymérase ARN dépendante L et son cofacteur la phosphoprotéine P
<b>PM :</b>	Souche rabique : Pitman-Moore
<b>PPE :</b>	Prophylaxie Post Exposition
<b>ppi :</b>	Pour préparations injectables
<b>PVRV :</b>	Purified Vero cell Rabies Vaccine
<b>RABV :</b>	Rabies virus
<b>RFFIT:</b>	Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test
<b>SAD B19 :</b>	Street Alabama Dufferin clone 19
<b>SAD :</b>	Street Alabama Dufferin
<b>SLT :</b>	Seed Lot de Travail
<b>SNC :</b>	Sérum normal de cheval
<b>SV40 :</b>	Simian Virus 40
<b>SVF :</b>	Sérum de veau foetal
<b>trs/mn :</b>	Tours par minute
<b>U.I :</b>	Unité Internationale
<b>UV :</b>	Ultra violet
<b>Vero :</b>	Cellules épithéliales de rein de singe vert
<b>WI-38 :</b>	Cellules diploïdes pulmonaires de fœtus humain du Wistar Institute de Philadelphie
<b>µm :</b>	Micromètre

**Liste des figures**

<b>Figure 1 :</b>	Représentation schématique du virion rabique.....	05
<b>Figure 2 :</b>	Organisation génomique du virus rabique.....	05
<b>Figure 3 :</b>	Pathogénie de l'infection rabique.....	07
<b>Figure 4 :</b>	Cycle cellulaire de la réplication virale.....	08
<b>Figure 5 :</b>	Mélange du virus rabique avec le tampon stabilisant pour la production de vaccin antirabique à usage humain (IPA-Kouba).....	17
<b>Figure 6 :</b>	Inactivation thermique du virus rabique.....	25
<b>Figure 7 :</b>	Inactivation thermique du virus rabique à 37°C dans le : PBS, MEM-0,1% BSA, NTE, BM-Sr2.....	34
<b>Figure 8 :</b>	Inactivation thermique du virus rabique à 56°C dans le : PBS, MEM-0,1% BSA, NTE, BM-Sr2.....	34
<b>Figure 9 :</b>	Incubation des mélanges virus rabique/stabilisant à 37°C.....	44
<b>Figure 10 :</b>	Préparation des dilutions de virus rabique.....	46
<b>Figure 11 :</b>	Inoculation intracérébrale du virus rabique aux souriceaux à la mamelle.....	46
<b>Figure 12 :</b>	Souriceaux avant inoculation en bonne santé.....	47
<b>Figure 13 :</b>	Souriceaux paralysés après inoculation.....	47
<b>Figure 14 :</b>	Représentation schématique du protocole expérimental.....	49
<b>Figure 15 :</b>	Evolution du titre du virus rabique (Moyenne±écart-type) après 7j en fonction de la température d'incubation.....	51
<b>Figure 16 :</b>	Evolution du titre du virus rabique (Moyenne±écart-type) après incubation dans le tampon ENDERS et dans le tampon PBS.....	53
<b>Figure 17 :</b>	Evolution du titre du virus rabique (Moyenne±écart-type) après incubation dans le saccharose (2%) et le sorbitol (1%).....	55
<b>Figure 18 :</b>	Evolution du titre du virus rabique (Moyenne±écart-type) après incubation dans le sorbitol (4%).....	57
<b>Figure 19 :</b>	Comparaison des titres du virus rabique (Moyenne±écart-type) obtenus entre les différents milieux stabilisants après 7j d'incubation à 37°C.....	59

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 1 :</b>	Classification des genres de lyssavirus, répartition géographique et les espèces hôtes correspondantes.....	04
<b>Tableau 2 :</b>	Composition des milieux stabilisants en pourcentage (%).....	35
<b>Tableau 3 :</b>	Les dilutions réalisées lors du titrage de la suspension virale.....	45
<b>Tableau 4 :</b>	Les titres viraux rabiques (en $\log_{10}1/DL_{50}$ ) sans ajout de stabilisants.....	50
<b>Tableau 5 :</b>	La perte du titre du virus rabique (en %) après 7j d'incubation à +4°C, 25°C et à 37°C.....	51
<b>Tableau 6 :</b>	Les milieux stabilisants évalués.....	52
<b>Tableau 7 :</b>	Les titres viraux rabiques (en $\log_{10}1/DL_{50}$ ) après incubation dans le tampon ENDERS et le tampon PBS.....	53
<b>Tableau 8 :</b>	Les titres viraux rabiques (en $\log_{10}1/DL_{50}$ ) après incubation dans le saccharose à 2% et le sorbitol à 1%.....	54
<b>Tableau 9 :</b>	Les titres viraux rabiques (en $\log_{10}1/DL_{50}$ ) après incubation dans le sorbitol à 4%.....	56
<b>Tableau 10 :</b>	Comparaison des titres du virus rabique (Moyenne $\pm$ écart-type) entre les différents milieux stabilisants après 7j d'incubation à 37°C.....	58
<b>Tableau 11 :</b>	Les surnageants viraux rabiques utilisés (Numéros et dates de récolte, le titre viral initial en $\log_{10}1/DL_{50}$ ).....	Annexe I

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	01
---------------------------	----

### PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

#### **GENERALITES :**

1. Définition de la maladie.....	03
2. Importance de la maladie en santé publique.....	03
3. Répartition mondiale, sources de contamination et modes de transmission.....	03
4. Le risque rabique en Algérie.....	04
5. L'agent étiologique : Le virus rabique.....	04
5.1.Classification.....	04
5.2. Aspects morphologiques et organisation structurale.....	05
5.3. Résistance dans le milieu extérieur.....	07
5.4.Trajet du virus rabique dans l'organisme.....	07
5.5.Stratégie de la multiplication virale.....	08
6. Physiopathologie, diagnostic, lutte et traitement de la rage.....	08
6.1.Aspects cliniques de la maladie.....	08
6.2.Aspect lésionnel de l'infection rabique.....	09
6.3.Défenses contre l'infection virale.....	10
6.4.Diagnostic de la rage.....	10
6.5.Prophylaxie et traitement.....	11

#### **CHAPITRE I : LE VACCIN ANTIRABIQUE (COMPOSITION, PRODUCTION ET CONTROLE)**

1. La vaccination et le vaccin antirabique.....	13
2. Descriptif général du process de formulation d'un vaccin antirabique.....	13
2.1.Composition d'un vaccin antirabique.....	13
2.1.1.La souche vaccinale.....	13
2.1.2.L'antigène vaccinal.....	14

---

2.1.3.Le milieu liquide.....	14
2.1.4.Les conservateurs et les stabilisants.....	14
2.1.5.L'adjuvant.....	15
2.2.Méthode de fabrication du produit biologique.....	15
2.2.1.La culture et amplification du virus rabique.....	15
2.2.2.La récolte du virus rabique.....	17
2.2.3.Incorporation de la valence antigénique dans le milieu stabilisant.....	17
3. Le contrôle du vaccin antirabique.....	18
3.1.Le contrôle de la stérilité.....	18
3.2.Le contrôle du titre initial.....	18
3.3.Le contrôle de la virulence résiduelle.....	18
3.4.Le contrôle d'activité.....	18
3.5.Le contrôle d'innocuité.....	19
3.6.Le contrôle de la stabilité du vaccin.....	19
4. Conditionnement et conservation du produit fini (PFC).....	21
5. Facteurs influençant l'efficacité de la réponse vaccinale.....	21
5.1.Les facteurs intrinsèques.....	22
5.1.1.Le choix du vaccin.....	22
5.1.2.La nature, dose et voie d'administration du vaccin.....	23
5.2.Les facteurs extrinsèques.....	23
5.2.1.La réponse de l'organisme vis-à-vis de l'antigène vaccinal.....	23
5.2.2.Importance de la chaîne de froid.....	23

## **CHAPITRE II : LES STABILISANTS DU VACCIN**

1. Historique.....	24
2. Les virus à ARN.....	24
3. Composition chimique et propriétés du virus rabique.....	24
4. Processus de dégradation de l'antigène vaccinal.....	26
5. Les méthodes de conservation de l'antigène vaccinal.....	27
5.1.Les formes pharmaceutiques.....	27
5.1.1.La lyophilisation.....	27
5.1.2.Les basses températures.....	27

5.2. Les formulations vaccinales.....	28
6. Les stabilisants.....	28
6.1. La stabilité d'un antigène vaccinal.....	28
6.2. Définition d'un stabilisant vaccinal.....	28
6.3. Composition globale d'une solution stabilisante.....	29
6.4. Les différents types d'agents stabilisants utilisés dans les préparations vaccinales.....	29
6.4.1. Les produits inorganiques.....	29
6.4.1.1. Les ions.....	29
6.4.1.2. Les sels.....	30
6.4.2. Les produits organiques.....	30
6.4.2.1. Les sucres.....	30
6.4.2.2. Les polyols.....	31
6.4.2.3. Les acides aminés.....	31
6.4.2.4. Les protéines.....	31
6.5. Mode d'action d'un agent stabilisant.....	32
7. La stabilité du virus rabique en milieux stabilisants.....	33

## **DEUXIEME PARTIE : ETUDE PRATIQUE**

1. MATERIEL ET METHODES.....	37
1.1. Matériel.....	37
1.1.1. Matériel biologique.....	37
1.1.2. Milieu de culture et réactifs.....	38
1.1.3. Matériel de laboratoire.....	38
1.2. Méthodes.....	39
1.2.1. Production du virus rabique ERA sur cellules Vero en mode stationnaire.....	39
1.2.1.1. La trypsination des cellules.....	40
1.2.1.2. Amplification et propagation du virus rabique sur les cultures de cellules... ..	40
1.2.1.3. Le suivi de la culture cellulaire.....	41
1.2.2. Récolte, clarification et contrôle des surnageants contenant le virus rabique.....	42
1.2.3. Etude de la stabilité du virus rabique ERA/Vero.....	43

1.2.3.1. Etude de la stabilité du virus ERA/Vero sans stabilisants.....	43
1.2.3.2. Etude de la stabilité du virus rabique en milieux stabilisants.....	43
1.2.4. Appréciation du titre du virus rabique par inoculation aux souriceaux.....	45
<b>2. RESULTATS ET INTERPRETATION.....</b>	<b>50</b>
2.1. Etude de la stabilité du virus rabique ERA/Vero sans stabilisants.....	50
2.2. Etude de la stabilité du virus rabique ERA/Vero en milieux stabilisants.....	52
2.2.1. Etude de la stabilité du virus ERA/Vero dans le tampon ENDERS et PBS.....	53
2.2.2. Etude de la stabilité du virus ERA/Vero dans la solution ENDERS/Saccharose et ENDERS/Sorbitol.....	54
2.2.3. Etude de la stabilité du virus ERA/Vero dans la solution PBS/Sorbitol et eau distillée/Sorbitol.....	56
<b>3. DISCUSSIONS.....</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>69</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>71</b>
<b>ANNEXES</b>	
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	

## INTRODUCTION

Dans le monde, plus de la moitié des agents pathogènes connus affectant les humains sont d'origine animale et plus de deux cents zoonoses ont déjà été décrites dans le monde depuis des siècles et l'intérêt pour ces maladies ne cesse de croître auprès des services de santé publique.

Classée comme zoonose majeure et maladie à déclaration obligatoire par les pouvoirs publics algériens (**JORA, 1995**), la rage sévit toujours à l'état enzootique dans notre pays et a fait l'objet de plusieurs études épidémiologiques (**Metallaoui, 2009**). Elle continue de tuer en Algérie par négligence le plus souvent et par ignorance du risque vital. À l'instar des pays développés où les vecteurs principaux sont des mammifères sauvages et/ou chauves-souris, dans les pays en voie de développement le chien est toujours le vecteur principal.

Des mesures de surveillance sanitaire en plus de la vaccination, contribuent dans une large mesure à la lutte contre cette maladie (**Dodet et al., 2010**). Dans le vaccin, il est impératif que l'intégrité des antigènes viraux soit conservée pour que l'action vaccinnante soit efficace (**Amorij et al., 2008**). Un problème fondamental dans la préservation des vaccins viraux est la perte du titre du virus liée à des conditions non appropriées de stockage, la sélection du milieu stabilisant lors de la production du vaccin constitue également une étape critique (**Adebayo et al., 1998**).

Le maintien de la stabilité thermique des vaccins est le facteur primordial pour assurer une immunisation efficace (**Wollf et al., 2008**). L'instabilité des vaccins peut être mise en cause lorsque ces vaccins sont utilisés à grande échelle dans les régions à climat chaud et où ils peuvent accidentellement être exposés aux températures élevées ambiantes, notamment dans le cas où la chaîne du froid depuis le laboratoire de fabrication jusqu'au lieu d'utilisation peut s'avérer insuffisante (**Barme, 1985**).

Les formulations des vaccins qui résistent aux stress de températures, auraient des bénéfices majeurs (**Levin et al., 2007**) : la réduction du gaspillage de vaccins, aide à assurer l'efficacité du vaccin, être moins dépendant de la supplémentation et de l'équipement de la chaîne du froid, l'élargissement des programmes d'immunisation en facilitant le stockage et la distribution du vaccin à des températures ambiantes contrôlées, permettre aux activités vaccinales de continuer dans les situations émergentes où la chaîne du froid pourrait être compromise.

Le virus de la rage est un virus fragile (**Bevilacqua et al., 2004, Sastre et al., 2007**) donc particulièrement sensible, et par conséquent il peut se dégrader dans les préparations vaccinales ce qui peut diminuer de l'efficacité du vaccin. D'autre part, nous avons constaté des baisses du titre viral pendant le stockage et aussi pendant les étapes de lyophilisation. Le recours à des agents stabilisants s'avère indispensable pour ce virus.

Un vaccin antirabique thermostable, promet donc de simplifier la logistique de distribution des vaccins et d'améliorer la couverture vaccinale contre cette maladie. Ainsi, dans le but d'assurer une meilleure protection des animaux vaccinés contre la rage, nous avons étudié la thermostabilité du virus rabique, en soumettant la souche ERA/Vero utilisée dans la production du vaccin antirabique par l'Institut Pasteur de Kouba, à un vieillissement accéléré en présence d'agents dits stabilisants.

Le travail entrepris a consisté à :

- Voir dans quelle mesure des agents stabilisants de virus rabique, peuvent améliorer sa conservation en vue de leur utilisation dans le vaccin antirabique, même lorsque ces derniers sont soumis à des températures élevées pendant des durées prolongées. Le but est la production de vaccins antirabiques stabilisés dans des conditions économiques.

- Améliorer à l'échelle de laboratoire la conservation des surnageants viraux rabiques après leur récolte et qui sont destinés à la préparation du vaccin antirabique. L'incorporation de ces produits protecteurs a pour but la conservation pendant une plus longue durée, sans induire une altération ou diminution significative du titre.

## **Partie bibliographique**

# **Généralités**

## 1. Définition de la maladie

Le mot rabies (rage) a son origine en sanskrit « rabbahs » et grec « lyssa ou lytta », signifiant faire violence.

Cette anthroponose, est une infection virale du système nerveux central qui touche essentiellement les mammifères à sang chaud et particulièrement les canidés et les espèces sauvages (Carnivores et Chiroptères) (Fooks *et al.*, 2003). Elle est transmise accidentellement à l'homme et réalise un tableau de méningo-encéphalite indubitablement mortelle (Tiembré *et al.*, 2010). Son évolution clinique chez l'homme en fait une des maladies les plus dramatiques par les souffrances qu'elle occasionne, aggravée par le maintien et souvent l'exacerbation de la conscience qu'ont les malades de leur état.

## 2. Importance de la maladie en santé publique

Historiquement, la rage est l'une des viroses les plus effrayantes de l'homme. Le nombre de décès humains dûs à la rage dans le monde est estimé à environ 55 000 par an (Knobel *et al.*, 2005, Tiembré *et al.*, 2010). L'Afrique après l'Asie est le deuxième continent le plus touché, et paie un lourd tribut à cette maladie avec 44 % du total (Bourhy, 2007). Les personnes les plus touchées étant les habitants des communautés rurales défavorisées, en particulier les enfants.

## 3. Répartition mondiale, sources de contamination et modes de transmission

Le virus rabique est retrouvé dans le monde entier, chez les animaux terrestres domestiques et sauvages, aussi bien que chez les chauves-souris (Malerczyk *et al.*, 2009). A leur contact, l'homme peut se contaminer et constitue en règle générale le maillon final de la chaîne infectieuse, car il ne transmet pas la maladie. La maladie ré émerge cependant sous forme enzootique particulièrement en Asie, l'Afrique, et l'Amérique latine (Nagarajan *et al.*, 2009).

Habituellement transmise à l'homme par morsure, griffure, léchage sur plaie à partir d'un animal enragé et par projection de matière infectieuse sur les muqueuses (Warrell *et Warrell*, 2004). Le virus peut être transmis par l'inhalation d'aérosols et des cas de transmission par transplantation de cornée ont été décrits chez l'homme (Aubry *et Rotivel*, 2001).

#### 4. Le risque rabique en Algérie

En Algérie, la rage est une véritable menace pour la santé publique. Le contexte épidémiologique est marqué par une enzootie de rage canine qui accroît le risque pour la population humaine. Toutes les études menées sur une période de plus d'un siècle (1894-2008) convergent sur le rôle de "réservoir" que joue le chien dans le maintien et la propagation du virus de la rage en Algérie. La répartition géographique de l'infection rabique chez les animaux était presque identique depuis plus de 45ans. Si les régions d'extrême Sud demeurent indemnes, au Nord, l'infection rabique est importante au niveau des villes du centre et de l'Est (**Metallaoui, 2009**).

#### 5. L'agent étiologique : Le virus rabique

##### 5.1. Classification

Les virus qui induisent la rage appartiennent à l'ordre des Mononegavirales, le prototype du genre Lyssavirus et de la famille des Rhabdoviridae.

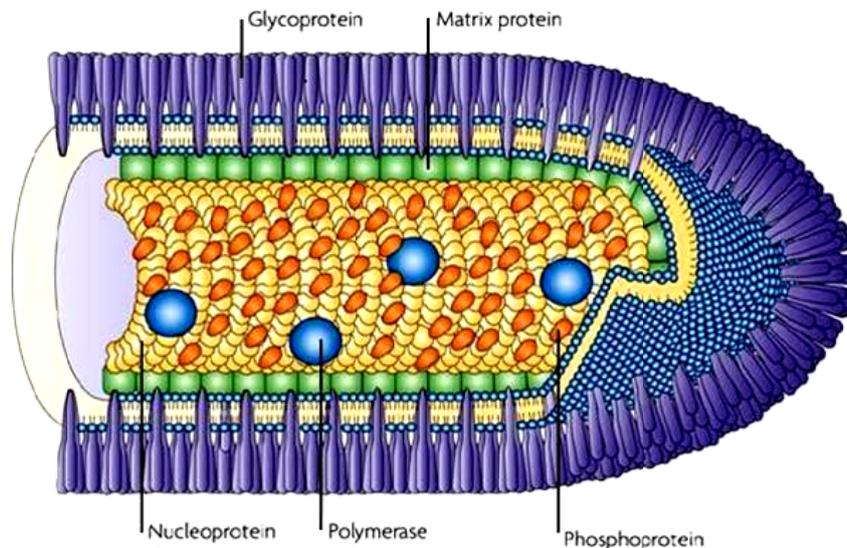
Le comité international de taxonomie des virus classe 7 génotypes avec les 4 génotypes récemment identifiés (**Johnson et al., 2010a**) (**Tableau 1**). Ceux du génotype 1 sont les plus préoccupants tant par leur nombre que par leur répartition géographique quasi mondiale.

**Tableau 1 : Classification des genres de lyssavirus, répartition géographique et les espèces hôtes correspondantes (Johnson et al., 2010a)**

Lyssavirus	Génotype	Hôte	Distribution géographique
Virus de la rage classique (RABV)	1	Plusieurs espèces de carnivores et de chiroptères	Monde entier
Lagos Bat Virus (LBV)	2	Chauves souris	Afrique
Mokola Virus (MOKV)	3	Inconnu	Afrique
Duvenhage Virus (DUVV)	4	Différentes	Afrique du Sud
European Bat LyssaVirus (EBL1 et EBL 2)	5 et 6	espèces de	Europe
Australian Bat LyssaVirus (ABLV)	7		Australie
Aravan, Khujand, Irkut, West Caucasian Bat Lyssavirus (WCBV)	Non classé	chauves souris	Asie

## 5.2. Aspects morphologiques et organisation structurale

Le virus se présente sous forme d'un noyau creux, cylindrique, arrondie à une extrémité et aplatie à l'autre, ressemblant à une balle de fusil « bullet shaped », d'une longueur de 180nm et d'un diamètre de 75nm (Hummeler *et al.*, 1967) (Fig 1).

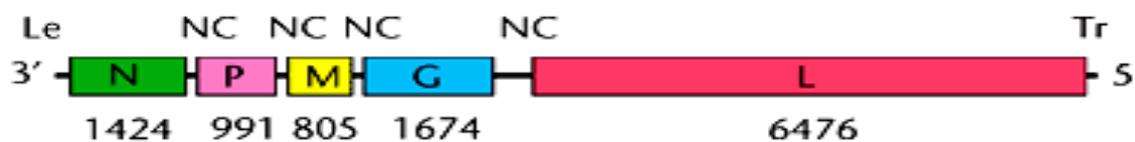


**Fig 1 : Représentation schématique du virion rabique (Schnell *et al.*, 2010)**

La particule virale est constituée de deux parties essentielles sur le plan structural et fonctionnel : la nucléocapside (le noyau) et l'enveloppe externe (la membrane virale). Un manchon de protéines N recouvre le génome viral, qui s'associe avec les protéines L et P formant le complexe ribonucléoprotéine (RNP), enroulé en hélice (Finke *et al.*, 2004). Ce complexe (RNP) est entouré par une enveloppe lipidique qui contient les protéines M et G (Lafon, 2005).

### 5.2.1. Le génome viral

L'étude du génome montre qu'il a une organisation génomique simple (Fig 2). Il est constitué par une succession de régions codantes et de régions non codantes. Il est formé d'un ARN "leader", de 5 ARN messagers et d'un ARN "trailer" (Nadin-Davis, 2010).



**Fig 2 : Organisation génomique du virus rabique (Nadin-Davis, 2010)**

Le génome viral est un ARN monocaténaire, non segmenté de sens négatif approximativement de 12Kb (**Tordo et al., 1986, Bourhy et al., 2008**). Il code pour 5 protéines structurales : la glycoprotéine (G), la nucléoprotéine (N), matrix protéine (M), l'ARN polymérase (L) et la phosphoprotéine (P) (**Faber et al., 2009**).

### 5.2.2. Les protéines virales et leurs fonctions

#### ✚ La glycoprotéine (G)

C'est la protéine la mieux étudiée sur le plan structural et immunologique. Elle est ancrée dans la membrane virale, et forme des peplomères qui se projettent à la surface du virus (**Benmansour et al., 1992**), lui donnant un aspect hérissé sur les images de microscopie électronique. Environ 400 spicules de glycoprotéines sont présentes sur la membrane plasmique du virus de la rage (**Flamand et al., 1993**)

#### ✚ La protéine (N)

C'est la protéine la plus abondante dans la particule virale. Elle est étroitement associée à l'ARN génomique, sa fonction première est d'encapsider le génome viral et le protéger contre la digestion par les ribonucléases (**Albertini et al., 2005**).

#### ✚ La protéine (M)

C'est la plus petite des protéines virales. Elle tapisse la couche interne de la membrane virale (**Fig1**). Elle est responsable de l'organisation en hélice de la RNP, et le bourgeonnement des virions (**Wunner et al., 2004**). Cette protéine peut être divisée en deux : la protéine M<sub>1</sub> associée à la nucléocapside et la protéine M<sub>2</sub> associée à la membrane lipidique (**Benmansour et al., 1992**).

#### ✚ La protéine (L) et la protéine (P)

Cette protéine géante (L pour : large), occupe plus de la moitié du génome rabique (**Meslin et al., 1999**). Avec son cofacteur la protéine P, elles jouent un rôle régulateur dans les phénomènes de transcription/réplication (**Lahaye et al., 2009**).

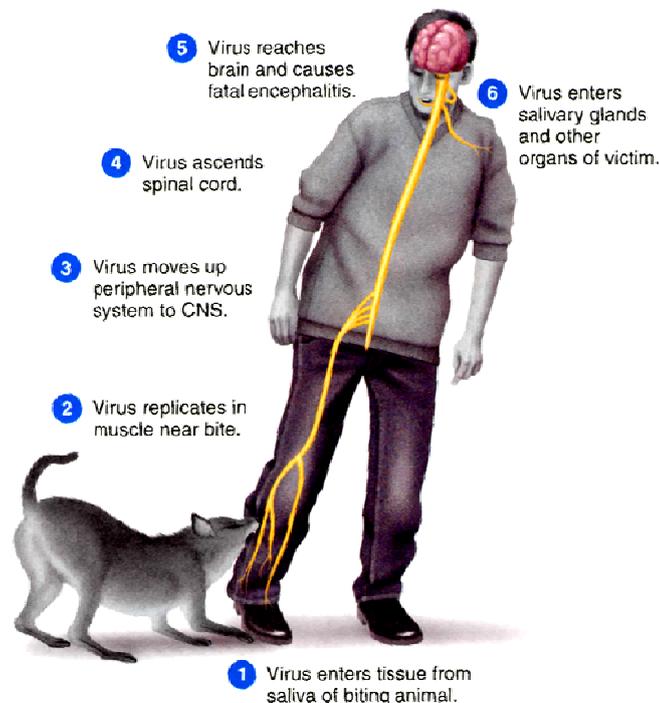
Toutes ces protéines jouent un rôle dans la protection contre la rage, cependant, la protéine G est le principal antigène viral qui joue un rôle prépondérant dans l'immunité antirabique (**Cox et al., 1977**), et c'est l'élément majeur qui contribue à la pathogenèse de la rage (**Faber et al., 2007**).

### 5.3. Résistance dans le milieu extérieur

Dans la nature, le virus rabique est labile (**Rupprecht et Gibbons, 2004**). La lumière, le contact de l'air et les ultra-violets sont des agents d'inactivation (**Lepine et Gamet, 1969**). Il est très sensible aux solvants des lipides (éther et chloroforme) et aux désinfectants classiques : les ammoniums quaternaires, l'eau de javel, le formol. Il résiste à la putréfaction, et peut être conservé par le froid, la lyophilisation et la glycérine (**Mammette, 2002**).

### 5.4. Trajet du virus rabique dans l'organisme

Le virus rabique utilise la voie neuronale stricte, sans jamais emprunter la voie sanguine ce qui explique l'absence de virémie (**Fig 3**).

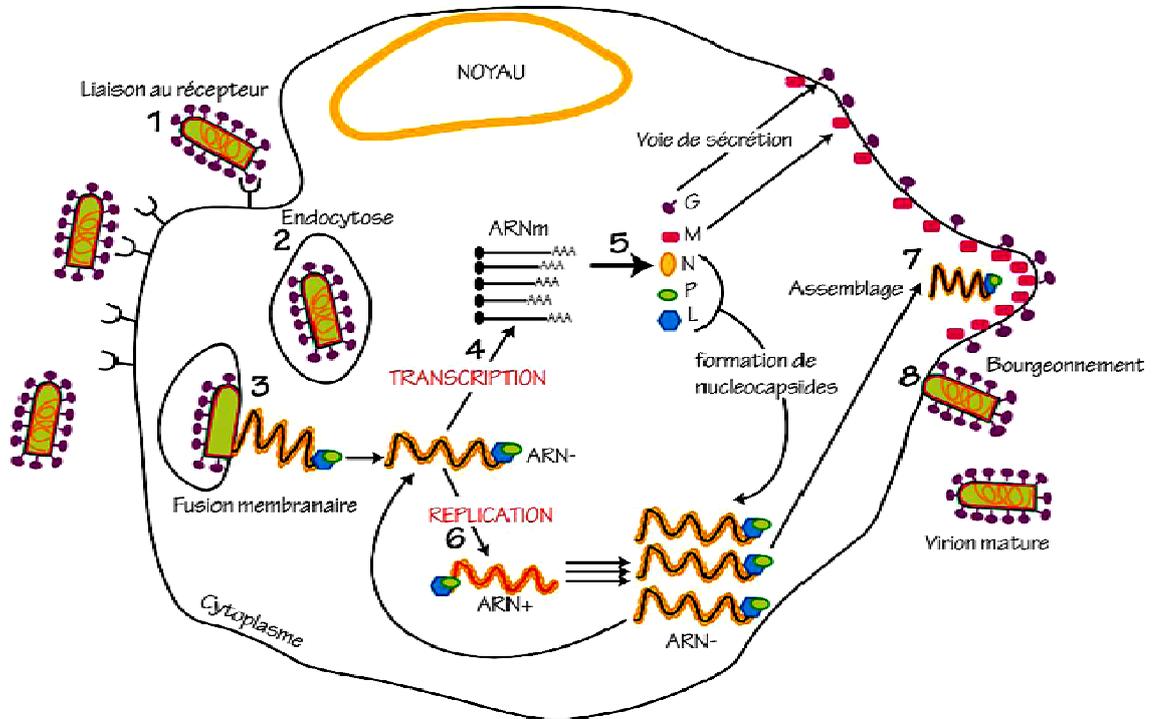


**Fig 3 : Pathogénie de l'infection rabique (Tortora et al., 2010)**

Après inoculation, il chemine le long des neurones périphériques par voie axonale rétrograde (**Tuffereau et al., 2007**), vers le système nerveux central et se multiplie massivement dans les neurones (**Warrell et Warrell, 2004**). Après avoir envahi les centres nerveux, le virus est réacheminé par le flux axoplasmique antérograde vers divers tissus extra neuraux dont les glandes salivaires, qui participent activement au cycle de la maladie, en permettant sa transmission (**Aubry et Rotivel, 2001**).

## 5.5. Stratégie de la multiplication virale

Le cycle viral des Rhabdovirus se déroule entièrement dans le cytoplasme de la cellule hôte. Il se décompose en trois étapes principales (**Fig 4**) :



**Fig 4 : Cycle cellulaire de la réplication virale (Albertini, 2006)**

Le virus entre dans la cellule en se fixant sur la membrane cellulaire par la glycoprotéine G qui se lie à des récepteurs potentiels, s'ensuit l'internalisation du virus par endocytose (**Thoulouze et al., 1998**). Puis, multiplication virale par libération de la nucléocapside dans le cytoplasme, qui servira pour la réplication et la transcription par le complexe protéique P-L polymérase, il y a synthèse d'ARN<sub>m</sub> et d'ARN positif, matrice pour la synthèse des nouveaux génomes viraux (**Lahaye et al., 2009**). Enfin, sortie du virus de la cellule infectée par assemblage des nouvelles particules virales, qui bourgeonnent et se détachent pour être libérées hors de la cellule hôte (**Wunner et al., 2004**).

## 6. Physiopathologie, diagnostic, lutte et traitement de la rage

### 6.1. Aspects cliniques de la maladie

La maladie classique peut être divisée en 5 stades : l'incubation, le prodrome, la phase aiguë neurologique, le coma et la mort (**Hemachudha et al., 2007**). Plusieurs formes cliniques existent et quelque soit la forme le pronostic est toujours fatal.

### 6.1.1. Incubation

Cette période silencieuse et asymptomatique peut durer de quelques jours, quelques mois (1 à 3 mois), et très rarement quelques années (**Rupprecht et al., 2010**).

Chez l'homme, dans 85 % des cas elle est entre 35 et 90 jours, dans 10 % des cas inférieure à 20 jours et dans 5 % des cas supérieure à 3 mois (**Bevilacqua et al., 2004**), chez l'animal, cette période est généralement plus courte (**Lepine et Gamet, 1969**).

Puis, les signes précoces commencent à apparaître, associés : fièvre, des troubles du comportement, paresthésie et épuisement (**Johnson et al., 2010a**). Ensuite, il y a progression vers la phase d'état :

### 6.1.2. Symptômes chez l'homme

La forme furieuse « agressive » est la plus décrite chez l'homme (**Fooks et al., 2003**).

La phase d'état est spastique (encéphalique) : agitation, confusion, hydrophobie et aérophobie, hypersalivation et des convulsions (**Plotkin, 2000**). La forme paralytique est moins fréquente : avec paralysie progressive ascendante, atteignant les membres inférieurs, provoquant des troubles sphinctériens, et enfin une paralysie des nerfs crâniens, et le patient succombe à un arrêt cardiorespiratoire (**Bevilacqua et al., 2004**).

### 6.1.3. Symptômes chez l'animal

Dans l'espèce canine, les deux formes (furieuse et paralytique) sont souvent attribuées à cette espèce (**Hemachudha et al., 2007**). Dans la forme furieuse le chien présente des troubles hallucinatoires visuels et auditifs, une hypersalivation, une voix rauque, et cherche à mordre tout ce qui l'entoure. Alors que dans la forme paralytique ou muette, le chien n'aboie pas, il n'y a aucune tendance à l'agressivité, avec dominance des signes paralytiques (**Lepine et Gamet, 1969**). Les bovins présentent en début d'évolution des signes laryngés (modification du beuglement) qui peuvent évoquer la présence d'un corps étranger (signe trompeur). Le chat présente généralement la forme furieuse, il s'agit d'un animal particulièrement dangereux pour l'environnement humain. Perte de méfiance chez le renard, qui se rapproche des habitations (**Fleury, 2002**).

## 6.2. Aspect lésionnel de l'infection rabique

L'infection par le virus rabique, induit la formation de lésions spécifiques dans le système nerveux central, observées au microscope optique et caractérisées par des agrégats

de protéines cytosoliques appelées corps de Negri (**Ménager et al., 2009**), constitués par l'accumulation des protéines de nucléocapside virale (**Fleury, 2002**).

### **6.3. Défenses contre l'infection virale**

Lors d'une agression par le virus rabique, l'organisme met en action des mécanismes d'immunités innées et adaptatives (**Franka et al., 2009**).

Le virus étant incapable de traverser une peau saine, il y a effraction cutanée au moment même du contag. Une réaction inflammatoire non spécifique se déclenche induisant la production d'interféron (INF) qui va inhiber la réplication virale, et activer les cellules tueuses NK et les cellules dendritiques (**Brzózka et al., 2005**).

Si le virus rabique n'est pas totalement détruit au stade précédent, la réaction immunitaire spécifique se déclenche et implique l'immunité à médiation cellulaire par l'activation de lymphocytes T cytotoxiques (CD8) (**Hooper, 2005**) qui tuent de façon spécifique les cellules infectées par le virus rabique, et des lymphocytes T helper (CD4), dont le rôle le plus important est un rôle d'aide dans la synthèse des anticorps par les lymphocytes B (**Celis et al., 1988**). L'immunité à médiation humorale par les anticorps neutralisants qui est la source la plus importante de protection contre l'infection par le virus rabique, les anticorps neutralisent le virus avant qu'il n'infecte les cellules nerveuses. La glycoprotéine G est le seul antigène rabique capable d'induire la formation d'anticorps neutralisants (**Cox et al., 1977, Beckert et al., 2009**).

### **6.4. Diagnostic de la rage**

Le diagnostic de la rage est parfois suggéré par les données épidémiologiques (La morsure) et cliniques, mais le seul moyen d'établir un diagnostic fiable de rage est d'identifier le virus au moyen de techniques de laboratoire.

#### **6.4.1. Identification immunohistochimique de l'antigène rabique**

L'immunodetection par immunofluorescence directe (IF), est la technique de référence, recommandée par l'OMS et l'OIE pour le diagnostic de la rage. Elle est réalisée par un étalement, les antigènes rabiques présents dans le tissu, sont reconnus spécifiquement par des immunoglobulines rabiques marqués par un fluorescent. Ces inclusions correspondent à des agrégats de nucléocapsides rabiques (**OMS, 1973, OIE, 2005**). L'immunomarquage à la peroxydase, présente quelques analogies avec l'IF, sauf que dans ce cas l'anticorps est couplé à une enzyme, la peroxydase (**OMS, 1984**).

#### **6.4.2. L'inoculation à la souris**

Elle consiste en l'inoculation intracérébrale de l'échantillon suspect à des souris ou à des souriceaux à la mamelle. Les animaux sont contrôlés tous les jours pendant 28 jours par observation des signes cliniques de la rage (OIE, 2005). D'autres moyens sont utilisés pour la mise en évidence du virus rabique, tel que l'infection de cellules (Neuroblastomes) en culture, qui permet de porter rapidement (2-4j) un diagnostic (McElhinney et al., 2008).

#### **6.4.3. La sérologie**

Le diagnostic sérologique est rarement utilisé, en raison de la séroconversion tardive, il n'a donc qu'un intérêt limité dans le diagnostic de la rage. L'OIE a prescrit l'épreuve de RFFIT comme technique de titrage des anticorps antirabiques, permettant 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, et la limite de neutralisation est déterminée. La technique ELISA a été acceptée par l'OIE comme outil pour le screening (McElhinney et al., 2008).

Par ailleurs, des techniques de biologie moléculaire par polymérisation en chaîne (PCR) (Kissi et al., 1999), permettent la mise en évidence *intra vitam*, de l'ARN viral dans les liquides biologiques (la salive, le LCR, biopsie cutanée, urines) (McElhinney et al., 2008).

### **6.5. Prophylaxie et traitement**

Comme l'a démontré Pasteur et ses prédécesseurs il y a maintenant plus de deux cents ans, la seule thérapeutique de la rage, réside dans la prévention au moyen de vaccins spécifiques.

#### **6.5.1. La lutte contre la rage**

La voie à suivre devrait être d'éliminer les chiens et les chats errants, d'identifier et vacciner tous les autres carnivores domestiques. La vaccination en masse, a été le support de la réussite des programmes de contrôle de la rage canine dans certains continents à travers le monde, elle a permis d'éliminer la rage humaine (Cleaveland et al., 2006). En plus du succès prophylactique obtenu dans certains pays de l'Europe (France) grâce à la vaccination orale, exemple de l'utilisation du vaccin atténué SAD B19 (Beckert et al., 2009), consistant à déposer sur le terrain des appâts d'abord primitifs, puis fabriqués industriellement, contenant

une capsule plastique emplie de vaccin (**Aubert, 2003**). Une telle politique nécessite toutefois un cadre légal fort pour être traduite dans les faits.

### **6.5.2. La prophylaxie**

La vaccination préventive, n'est utilisée que pour les personnes en contact avec le virus comme les vétérinaires, les fermiers et le personnel de laboratoire qui manipule le virus rabique, à cette fin, l'OMS recommande une série primaire d'immunisation à j0, j7, et j28 (ou j21) avec rappel (**WHO, 2010**).

### **6.5.3. Le traitement**

Il n'existe aucun médicament efficace pour empêcher le processus viral de continuer une fois les premiers symptômes apparus, la seule façon de se protéger contre le virus est de se faire vacciner (**Koprowski, 2009**). Après exposition, il semble essentiel de bloquer le virus avant qu'il ne puisse arriver au système nerveux central. Le sérum antirabique d'origine humaine ou équine le plus souvent, a fait preuve de son efficacité, et l'action bénéfique du sérum antirabique en association au vaccin a été bien démontrée.

#### **6.5.3.1. Le traitement local des plaies**

Le traitement local des plaies après exposition revêt une importance capitale. Un nettoyage immédiat et soigneux de toutes les blessures qui risquent d'être contaminées par le virus rabique, à l'eau et au savon de Marseille, puis un rinçage abondant, mais on diffère la suture. Il est conseillé d'appliquer une solution antiseptique, de consulter un médecin qui vérifiera la vaccination antitétanique et prescrira éventuellement une antibiothérapie ainsi qu'une prise en charge spécialisée (**Guérin, 2005, Caron, 2008**).

#### **6.5.3.2. Administration du sérum et du vaccin antirabique**

Le traitement post exposition consiste en une vaccination et une administration obligatoire d'immunoglobulines antirabique pour le grade III (personnes sévèrement mordues : blessures profondes et multiples, situées au niveau de la tête,...ect), le plus tôt possible, afin d'anticiper la réponse immunitaire de la personne qui a eu un contact suspect. Pour cela, l'OMS (**WHO, 2010**) a également mis en place un autre protocole d'immunisation approprié.

**Chapitre I : Le vaccin antirabique**  
**(Composition, production et contrôle)**

Partie d'une observation empirique d'immunité croisée entre deux maladies, la vaccine et la variole, la vaccination est devenue une science à part entière. Débutant par l'isolement de l'agent pathogène, sa culture, son atténuation ou son inactivation pour fabriquer un vaccin.

## **1. La vaccination et le vaccin antirabique**

La vaccination consiste à introduire chez un individu une préparation antigénique dérivée ou proche d'un agent infectieux déterminé, de manière à informer l'organisme des caractéristiques de cet agent afin qu'il puisse le reconnaître et se défendre contre lui lorsqu'il le rencontre dans la nature (**Guérin, 2007**). La vaccination joue sur la mémoire immunitaire : elle permet la mise en place rapide de moyens de défense spécifiques qui prennent de vitesse le développement de l'infection. Le vaccin antirabique est une substance immunogène, administrée préventivement ou après exposition. Il suscite dans l'organisme une réponse immunitaire (Anticorps et lymphocytes) qui neutralise le virus avant que celui-ci n'atteigne le cerveau (**Johnson et al., 2010b**). Il doit donc être instauré le plus tôt possible après contact avec un animal suspect de rage.

## **2. Descriptif général du process de formulation d'un vaccin antirabique**

Les vaccins se différencient des produits pharmaceutiques classiques par l'origine biologique de leurs principes actifs. Ces derniers proviennent de systèmes de production auxquels participent des organismes vivants.

### **2.1. Composition d'un vaccin antirabique**

Tant la composition d'un vaccin que la notification de sa composition peuvent varier d'un pays à l'autre, les renseignements que l'on peut obtenir, ne permettent pas toujours d'en connaître la composition intégrale. Le vaccin antirabique présente la constitution suivante :

#### **2.1.1. La souche vaccinale**

Comparativement à la souche des « rues » de virus rabique qui n'a subi aucun traitement, isolée à partir d'une population animale domestique ou sauvage (principalement canine), et sert à des travaux de recherche, la souche dite « fixe », dès l'origine et après isolement, est cultivée et subie de nombreux passages sur cellules ou sur animal (**Lepine et Gamet, 1969**). Le but est d'obtenir un comportement biologique reproductible et caractéristique. Une fois les paramètres fixés et répertoriés, elles sont utilisées pour la production de vaccins antirabiques.

Encore appelée souche de « laboratoire », les souches fixes dérivent historiquement de trois isolats de virus rabique (**Clark et 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 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) et Flury HEP (High Egg Passage).

### 2.1.2. L'antigène vaccinal

L'antigène peut se présenter sous forme d'agent viral entier, vivant ou inactivé :

- Virus vivants atténués

L'agent viral a subi une atténuation de son pouvoir pathogène, grâce à des passages répétés sur des animaux ou sur des cultures de cellules (**Lubroth et al., 2007**). Il est capable de se multiplier une fois injecté dans l'organisme, mais n'atteint jamais le cerveau (Utilisé uniquement pour les animaux cibles, domestiques et sauvages).

- Virus inactivés ou tués

L'agent viral est entier, mais inactivé par un procédé chimique (le phénol, la  $\beta$ -propiolactone BPL) ou physique (les ultra-violets) (**Wiktor et al., 1972**). Ce procédé le rend non infectieux mais capable d'induire une protection immunitaire efficace

### 2.1.3. Le milieu liquide

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**). Suivant le mode de production du vaccin, il peut s'agir d'eau ppi, de sérum physiologique, ou de liquide plus complexe venant du milieu de culture (**Bégué, 2009**).

### 2.1.4. Les conservateurs et les stabilisants

Des composants autres que l'antigène entrent dans la formulation finale des vaccins, ces composants sont représentés par : les diluants et les tampons pour ajuster le pH du vaccin (**Contorni et Massimo, 2010**), des stabilisants et des agents protecteurs ou conservateurs,

qui contribuent à la qualité, la sécurité et l'efficacité du vaccin (**Jadhav et al., 2009**). Ils sont utilisés pour préserver l'activité virale ou pour stabiliser l'antigène (**Chun et al., 2004**) et pour inhiber ou prévenir la croissance bactérienne (antibiotiques).

### **2.1.5. L'adjuvant**

Le mot adjuvant dérive du latin « Adjuvar » signifiant aidé. Ce sont des composants utilisés pour augmenter et prolonger la réponse immunitaire du vaccin (**Reed et al., 2008**). Sont utilisés, des sels d'aluminium (hydroxide d'aluminium), des huiles minérales et d'autres produits, utilisés uniquement pour les vaccins à usage vétérinaire.

## **2.2. Méthode de fabrication du produit biologique**

Les fabricants se sont imposés des contraintes importantes, qui s'ajoutent à un cadre réglementaire très strict mis en place par les pouvoirs publics. Les conditions de stérilité et d'asepsie sont très strictes. Nous pouvons décrire la chaîne ou le processus de production suivant :

### **2.2.1. La culture et amplification du virus rabique**

La fabrication d'un vaccin antirabique débute par la création d'une banque de souches productrices. Pour cela, nous mettons en culture selon des règles d'asepsie strictes et des conditions constantes, la souche productrice (SLT) (**Meslin et al., 1999**). Ainsi, de grandes quantités d'antigène (Récolte virale) qui serviront à la production de vaccins sont obtenues, et cela par l'utilisation de différents procédés. Le vaccin antirabique fabriqué au siècle dernier par Louis Pasteur était un broyat de moelles de lapins inoculés, inactivés par dessiccation. Les vaccins ultérieurs produits sur cerveau d'animaux adultes ou d'animaux nouveaux nés, ont été remplacés dans les années 60 par les vaccins produits sur culture cellulaire (**Dureux, 1974**). A travers cette série de mise au point, découle la notion de générations de vaccins antirabiques :

#### Les vaccins à base de tissu cérébral animal

Les vaccins fabriqués sur cerveau de mouton (Inde) ou de souriceau nouveau-né (Amérique du Sud, Algérie...), sont encore très largement utilisés dans les pays en voie de développement.

#### ✚ Les vaccins avianisés

Préparés sur un substrat constitué d'embryons de canard (PDEV) (**OMS, 2000**). Ce type de vaccin a été produit par l'Institut Pasteur d'Algérie, pour usage vétérinaire.

#### ✚ Les vaccins préparés sur cultures cellulaires

Le virus rabique est neurotrophe. Chez l'animal infecté après s'être répliqué dans le système nerveux central, il diffuse vers plusieurs autres organes dans les quels il se réplique souvent très bien. Il n'est donc pas surprenant que le virus rabique puisse être cultivé dans un grand nombre de cellules hôtes tel que les cellules BHK-21, NiL-2, Vero, MRC-5, WI-38, support très utilisé pour la fabrication de vaccins modernes à la base de la prophylaxie antirabique, citons comme exemple :

- Le vaccin préparé sur cultures de cellules diploïdes humaines (HDCV) (**Johnson et al., 2010b**).
- Un vaccin purifié préparé sur cultures de cellules d'embryon de poulet (PCECV) (**Sampath et al., 2010**).
- Et un vaccin purifié préparé sur cultures de cellules Vero (PVRV). Ces cellules constituent un substrat cellulaire acceptable pour la multiplication d'un éventail de virus ainsi que pour la production de vaccins viraux (polio virus, influenza, entérovirus) (**Chen et Chen, 2009**), elles sont couramment utilisées pour la production de vaccin antirabique.

Certes, à cause de leur coût élevé de production, ces vaccins sont produits et utilisés principalement dans les pays développés et d'autres pays émergents ayant maîtrisé cette technologie (Algérie, Maroc, Tunisie, Sénégal).

Entre autre, selon les nouvelles stratégies vaccinales l'antigène peut représenter une partie de l'agent viral produisant des vaccins dits génétiques (recombinants) et sous unitaires, qui ont fait l'objet de plusieurs publications :

#### ✚ Les vaccins recombinés vectoriels

Ce type de vaccin consiste en l'introduction d'un gène hétérologue (étranger) dans un vecteur (virus, bactérie, ADN), lorsque ce vecteur recombiné infecte une cellule, il induit la synthèse dans cette même cellule de l'immunogène correspondant (**Fischer, 2003**), comme exemple de ce type de vaccin : le vecteur virus de la vaccine exprimant la glycoprotéine rabique.

### ✚ Les 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, 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.

Après avoir choisis et amplifier la souche vaccinale sur un support déterminé pour la production du vaccin antirabique, vient l'étape de la récolte du produit de culture :

#### 2.2.2. La récolte du virus rabique

Ces cultures sont très importantes, non seulement parce qu'elles permettent de mieux connaître le virus lui-même, mais aussi parce qu'elles servent à produire de grandes quantités de virus destinées à la préparation de vaccins. Ces cultures sont contrôlées pour effectuer la récolte au moment le plus approprié, d'habitude 4 à 6 jours après inoculation des animaux, des œufs ou des cultures cellulaires (OIE, 2005). Les récoltes provenant de ces cultures contiennent non seulement le virus désiré, mais également des protéines et de l'ADN cellulaire, d'où intérêt de la purification (Pilette, 2009).

#### 2.2.3. Incorporation de la valence antigénique dans le milieu stabilisant

Après la mise au point du produit vaccinal, le produit biologique final est fabriqué (Fig5). Le mélange de la ou les valences antigéniques, et addition des différents produits (adjuvants, stabilisants, diluants) sont nécessaires à l'efficacité et à la conservation du vaccin (Kaplan et Koprowski, 1974).



**Fig 5 : Mélange du virus rabique avec le tampon stabilisant pour la production de vaccin antirabique à usage humain (IPA-Kouba) (Photos personnelle)**

La dernière étape de la production du vaccin antirabique est le contrôle du vaccin qui revêt une importance capitale :

### **3. Le contrôle du vaccin antirabique**

Soucieux d'assurer la meilleure protection des sujets vaccinés, les contrôles pratiqués tout au long de la chaîne de fabrication représentent souvent les trois-quarts du cycle de la fabrication. Nous distinguons le contrôle in process et le contrôle réalisé sur le produit fini :

Le contrôle in process, est fait à différents niveaux de la chaîne de production, en commençant par celle des matières premières, des procédés de fabrication, et des tests d'efficacité et de pureté. Les phases de contrôle prennent finalement beaucoup plus de temps que la fabrication elle-même. Elles comportent :

#### **3.1. Le contrôle de la stérilité**

Des épreuves de stérilité sont effectuées à chaque stade de la fabrication, ainsi que sur le vaccin en vrac et sur le produit fini au moyen de techniques normalisées. Le vaccin doit être stérile et exempt de tout agent contaminant.

#### **3.2. Le contrôle du titre initial**

La technique adéquate de titrage 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 un animal de laboratoire ou in vitro sur cellules, et des préparations ayant un titre de  $10^{-6}$ DL<sub>50</sub>/ml à  $10^{-8}$ DL<sub>50</sub>/ml produirons un vaccin ayant une activité antigénique satisfaisante (**Kaplan et Koprowski, 1974, Meslin et al., 1999**).

#### **3.3. Le contrôle de la virulence résiduelle**

En ce qui concerne les vaccins inactivés, les épreuves doivent porter essentiellement sur l'absence de virus résiduel vivant pour chaque lot de vaccin (**OMS, 1973**).

#### **3.4. Le contrôle d'activité**

Le contrôle lot par lot était assuré par le test de Habel, mais imprécis dans certains cas il a été remplacé par le test du NIH (National Institutes of Health) (**Krämer et al., 2009**). Le principe du test NIH consiste à vacciner des souris avec des quantités de plus en plus faibles

de vaccin de façon à déterminer la dose minimale encore capable de protéger 50% des animaux.

### **3.5. Le contrôle d'innocuité**

Le vaccin antirabique doit être parfaitement inoffensif. En plus du type de vaccin, les formulations de vaccins (diluants, préservateurs,...ect) et l'addition d'adjuvants, peuvent influencer les propriétés toxicologiques du produit biologique d'où l'intérêt de ce contrôle (**Verdier et al., 2003**). La meilleure façon de déceler la présence de ces agents, consiste à inoculer le vaccin à un animal de laboratoire de l'espèce choisie pour la production du vaccin (**OMS, 1973**). Tous les animaux d'expérience ne doivent présenter aucun signe de rage ou d'autres maladies.

### **3.6. Le contrôle de la stabilité du vaccin**

Historiquement, le test de stabilité des vaccins a été basé sur l'observation de la sensibilité à la température (**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 et ceux du groupe MMR (**WHO, 1992**).

Cependant, il n'existe pas de méthodes simples et peu onéreuses que l'on puisse utiliser sur le terrain pour déterminer si un vaccin conservé à la température ambiante a gardé au moins l'activité minimale requise. Cette activité ne peut être précisée qu'au moyen d'épreuves de laboratoire coûteuses dont les résultats ne sont souvent obtenus qu'après plusieurs mois (**Galazka et al., 1998**).

#### **3.6.1. Définition de la stabilité d'un vaccin**

La stabilité, comme les autres caractéristiques, est une qualité attribuée à un vaccin (**Schofield, 2009**). Elle se définit comme étant l'habilité à maintenir ces propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biologiques selon des limites spécifiées tout au long de sa durée de vie (**Knezevic, 2009**).

Afin de l'approbation de test clinique, de l'autorisation des vaccins et de la surveillance après autorisation, l'OMS (**WHO, 2009**) a élaboré une série de recommandations et de directives pour l'évaluation de la stabilité des vaccins et fournis un ensemble de définitions dans ce contexte :

### **3.6.2. Le test de stabilité**

Une série de tests désignés pour obtenir des informations sur la stabilité du vaccin dans le but de définir sa durée de conservation et sa période d'utilisation dans des conditions spécifiques de conditionnement et de stockage. Ce test est basé sur la détermination du changement d'une propriété du vaccin, qui peut être un indicateur direct ou indirect de l'immunogénicité et de l'efficacité.

### **3.6.3. Etudes accélérées de stabilité**

Ce sont des études désignées pour déterminer le taux de changement des propriétés du vaccin avec le temps, comme conséquences à l'exposition à des températures plus élevées que celles recommandées pour le stockage. Ces études peuvent fournir des données utiles pour établir la durée de conservation, mais elles ne devraient pas être utilisées pour prévoir les conditions réelles de stabilité du vaccin en temps réelle. Elles peuvent aussi fournir des informations préliminaires sur la stabilité du vaccin aux stades préliminaires de développement et aident dans l'estimation du profil de stabilité du vaccin.

### **3.6.4. La durée de conservation du vaccin**

La période durant laquelle, si le vaccin est stocké correctement, est prévu se conformer aux spécifications, tel que déterminé par les études de stabilité sur un certain nombre d'échantillon de vaccin, la durée de conservation est utilisée pour établir la date d'expiration d'échéance du vaccin. En général, la durée de conservation est de 12 à 18 mois pour les vaccins liquides et peut éventuellement atteindre 24 mois pour les vaccins lyophilisés (OIE, 2005).

L'OMS décrit un test basé sur l'utilisation en routine d'un essai de stabilité accéléré. Ce test consiste en l'exposition du vaccin à 37°C pendant 7 jours, le vaccin vivant doit conserver un titre minimal de  $3 \log_{10}$  pour chaque dose (Kaplan et Koprowski, 1974, Ohtake et al., 2010). Ce test permet de fournir des informations utiles concernant la stabilité du vaccin à +4°C (Peetermans et al., 1976). Dans ce cas, on a la garantie d'un pouvoir immunisant suffisant au moment de l'administration du vaccin.

En plus du contrôle in process, d'autres contrôles sont réalisés sur le produit fini notamment, le contrôle de la qualité du vaccin qui est basé sur la vérification pour chaque lot, de l'aspect, de la teneur en humidité résiduelle et la teneur totale en protéines, ainsi que le contrôle du pH (IPA, 2009).

#### 4. Conditionnement et conservation du produit fini (PFC)

Les vaccins sont des produits biologiques fragiles et d'une durée de vie relativement brève. Ils doivent être protégés contre les fluctuations de température, car une interruption de la chaîne du froid peut entraîner une réduction de l'efficacité ou de la durée de conservation des vaccins (**Moscov, 2007**). Les vaccins viraux, requièrent un stockage constant à des températures contrôlées, allant de -20°C jusqu'à 8°C, cela dépendra de la forme lyophilisée ou liquide du vaccin (**Rexroad et al., 2002**). Une exposition à des températures en dehors de celles-ci entraîne une diminution de l'immunogénicité du vaccin.

Quand toutes les épreuves effectuées sur le vaccin en vrac sont terminées et que leurs résultats sont satisfaisants, le vaccin est mis dans des boîtes. A la fin, les producteurs obtiennent un vaccin stabilisé, standardisé, stérile, conditionné et prêt à l'emploi.

#### 5. Facteurs influençant l'efficacité de la réponse vaccinale

Chaque année, l'Institut National de la Santé Animale acquière au près de l'Institut Pasteur d'Alger environ 100 000 doses de vaccin à usage vétérinaire. Ces vaccins sont ensuite distribués aux vétérinaires des services départementaux (**OMS, 1990, IPA, 2009**).

Ainsi, les vétérinaires du secteur privé ont de quoi lutter contre la rage. Malgré tous ces efforts consentis, la rage demeure en Algérie une maladie endémique et grave, elle continue de faire des victimes humaines et animales. Le facteur principal qui contribue à la persistance de la rage dans une région donnée, est le contact avec un animal non vacciné.

Par ailleurs, dans une enquête menée par **Metallaoui (2009)** sur la rage en Algérie, 60% des cas de rage humaine ne consultent qu'après l'apparition des signes cliniques, seuls 20 % des 40% restants consultent immédiatement, 8% consultent après 24 heures, les autres tardivement, généralement au delà de 48 heures. L'échec est de 40% malgré une prise en charge immédiate pour les motifs suivants :

- Pas de sérothérapie malgré la profondeur de la morsure ou sa localisation dans les zones trop sensibles.
- Refus de la vaccination par la personne mordue.
- Vaccination incomplète ou débutée tardivement 24h à 48h après la morsure.
- Achat du vaccin en retard par négligence ou motif financier.

Cependant, d'autres facteurs intrinsèques (liés au vaccin) et extrinsèques peuvent être responsables de la persistance de ce fléau :

## 5.1. Les facteurs intrinsèques

Pour être efficace, le vaccin doit être suffisamment antigénique, c'est-à-dire être capable de susciter la production d'anticorps en quantités suffisantes pour protéger l'organisme contre un contact potentiel.

### 5.1.1. Le choix du vaccin

Dans un pays comme le notre où les besoins sont importants, ce vaccin doit satisfaire aux meilleures conditions économiques c'est-à-dire être facile à produire à l'échelle industrielle, efficace, peu onéreux et d'emploi commode. Le choix d'un vaccin est à discuter de deux principaux points de vue :

#### ➤ La valeur antigénique

Afin d'assurer aux services nationaux responsables de la conduite des campagnes de vaccination des chiens, ainsi que les populations habitant dans les zones où ces opérations sont menées, de l'efficacité vaccinale, les laboratoires doivent produire des vaccins ayant une activité supérieure à 1U.I par dose de vaccin inactivé à la date de fabrication et capable de conserver une activité d'1U.I par dose au minimum pendant une période au moins égale à 6 mois, dans les conditions habituelles de stockage (2°C et 8°C) (**OMS, 1988**). Ainsi, le vaccin antirabique utilisé, doit avoir une activité au moins égale à 1U.I par dose au moment de son administration à l'animal (**Krämer et al., 2009**).

#### ➤ Le mode de présentation du vaccin

Il paraît essentiel de s'orienter vers un vaccin de technologie simple et économique. Un facteur majeur contribuant à une couverture vaccinale incomplète est la thermolabilité du vaccin, pour cela, il faut que le stockage et le transport du vaccin soit continu dans le froid afin d'assurer l'activité requise au moment de l'administration (**Friede et Aguado, 2005**).

Les vaccins à virus vivants présentent une certaine fragilité dans leurs conditions de préparation et de stockage, ils sont de ce fait moins stables que les vaccins à virus inactivés. Ces derniers doivent cependant contenir une masse importante d'antigènes et nécessitent fréquemment la présence d'adjuvant, ce qui explique leur coût de production plus élevé que les vaccins à virus vivants. Aussi, plus de 60% des vaccins sur le marché sont sous forme liquide (**Brandau et al., 2003**), ceux-ci engendrent plus de problèmes de stabilité que les vaccins lyophilisés (**Abdul-Fattah et al., 2007**).

### **5.1.2. La nature, dose et voie d'administration du vaccin**

Les échecs vaccinaux sont généralement imputables à des erreurs inhérentes au protocole de vaccination (**Nicholson, 1990**). La qualité antigénique des vaccins varie selon qu'ils sont constitués de germes vivants atténués ou inactivés. Les vaccins à virus vivants engendrent une meilleure réponse immunitaire que ceux inactivés. De même, la dose d'antigène administrée et le mode de préparation du vaccin peuvent influencer la réponse en anticorps (**Guérin, 2005**). Dans le cas de la rage, en plus de l'administration non appropriée de la PPE, le non nettoyage des plaies (**Johnson et al., 2010b**) ou l'administration du vaccin dans un site non recommandé peuvent également être associée à des échecs vaccinaux (**WHO, 2010**).

## **5.2. Les facteurs extrinsèques**

### **5.2.1. La réponse de l'organisme vis-à-vis de l'antigène vaccinal**

L'efficacité d'un vaccin dépend de la réceptivité de l'hôte à l'immunogène, de sa capacité à stimuler les moyens de défense de l'organisme mais aussi de l'adaptation de la réponse ainsi produite à neutraliser l'agent infectieux. Il s'agit d'une approche préventive et non curative, la cible finale du vaccin étant une population constituée de sujets sains.

Tragiquement, encore des millions d'individus (principalement des enfants) meurent de maladies pour les quelles le vaccin préventif existe. Une part significative de ce problème résulte de l'instabilité thermique de plusieurs des vaccins actuellement utilisés (**Brandau et al., 2003**). D'où le rôle primordial de la chaîne du froid dans le maintien de l'efficacité vaccinale :

### **5.2.2. Importance de la chaîne de froid**

Une attention scrupuleuse à la conservation et à la manipulation est nécessaire pour garantir l'activité optimale des vaccins. Tout les vaccins sont sensible à la chaleur, nécessitant l'utilisation de la chaîne du froid (**Braun et al., 2009**). La chaîne du froid fait référence à un processus de manutention sécuritaire qui permet de maintenir les vaccins à une température constante (entre 2°C et 8°C) depuis le moment de leur fabrication à celui où ils sont administrés (**Mallik et al., 2011**). Une interruption de la chaîne du froid peut entraîner une réduction de l'efficacité ou de la durée de conservation des vaccins.

Une fois que l'intégrité d'un vaccin est compromise, elle ne peut être rétablie (**Moscou, 2007**).

## **Chapitre II : Les stabilisants du vaccin**

## 1. Historique

Depuis les débuts du développement d'un vaccin, l'une des difficultés principales pour assurer la sécurité continue et l'efficacité d'un vaccin, était de stabiliser suffisamment l'antigène vaccinal dans le but de prévenir les dégradations qui peuvent altérer les paramètres influençant leur utilisation lors de la vaccination (**Pfleiderer, 2009**).

C'est en 1920 que des scientifiques français ont démontré que les vaccins lyophilisés ont une plus longue stabilité, et des techniques de séchage par le froid ont été développées depuis 1940. En plus de ces techniques, différents additifs ont été identifiés et qui peuvent aider à stabiliser les virus dans les vaccins vivants (**Stinchcombe et al., 2008**).

## 2. Les virus à ARN

La famille des Rhabdoviridae (virus de la rage), Paramyxoviridae (virus de la rougeole), Filoviridae (virus Ebola) appartiennent à l'ordre des Mononegavirales, des virus à ARN simple brin de polarité négative et enveloppés. Ces virus démontrent une plus grande labilité que les virus non enveloppés et sont donc plus sensibles à l'inactivation par le chauffage, et par conséquent plus difficile à stabiliser que les virus non enveloppés (**Sastre et al., 2007**).

## 3. Composition chimique et propriétés du virus rabique

La composition du virus rabique, permet d'expliquer en partie son comportement dans la nature et dans les différentes conditions de culture. L'enveloppe virale, semble se composer de trois couches concentriques : des projections extérieures, une couche épaisse de protéine et de lipide « micellaires », et une couche épaisse ressemblant à une membrane adjacente à la nucléocapside (**Vernon et al., 1972**).

Globalement, le virus de la rage est constitué de 4% d'ARN (**Sokol et al., 1969**), de 15 à 25% de lipides, jusqu'à 68 à 80% de protéines et 3 à 4% de glucides (**Toma et Koutchoukali, 1985**).

Il existe un ensemble de facteurs qui contribuent à la dégradation du virus rabique après sa récolte et durant le stockage, et les résultats du traitement du virus rabique sont confus. **Pinteric, Fenje et Almeida (1963)** suggèrent que le virus rabique a les caractéristiques sensibles de myxovirus, bien qu'**Andrewes et Horstmann (1949)** classifient le virus rabique comme résistant. Parmi ces facteurs nous pouvons citer :

### 3.1. La température

Sa composition à prédominance protéique (virus enveloppé), le rend particulièrement très sensible à la chaleur (Fleury, 2002, Bevilacqua et al., 2004). En solution de 0,1% d'albumine bovine à pH 7, sa demi-vie étant d'environ quelques heures à 40°C, 15 minutes à 50°C, et d'environ 35 secondes à 60°C et une ébullition de quelques secondes suffit à stériliser les produits virulents. Mais il est stable pendant plusieurs jours à 4°C (Toma et Koutchoukali, 1985).

Le virus rabique résiste au froid, et la congélation à -20°C, ces conditions lui assurent une très bonne conservation de la virulence (Lepine et Gamet, 1969). Il peut résister plusieurs années s'il est congelé à -70°C, ou lyophilisé et conservé entre 0 et 4°C (Toma et Koutchoukali, 1985). Le virus rabique résiste aux congélations et décongélations successives (Meslin et al., 1999).

A titre d'exemple, une suspension de virus rabique de la souche fixe Pasteur cultivée sur cerveaux de souris adultes et partiellement purifié, a été exposée à différentes températures pendant différentes périodes (Fig 6).

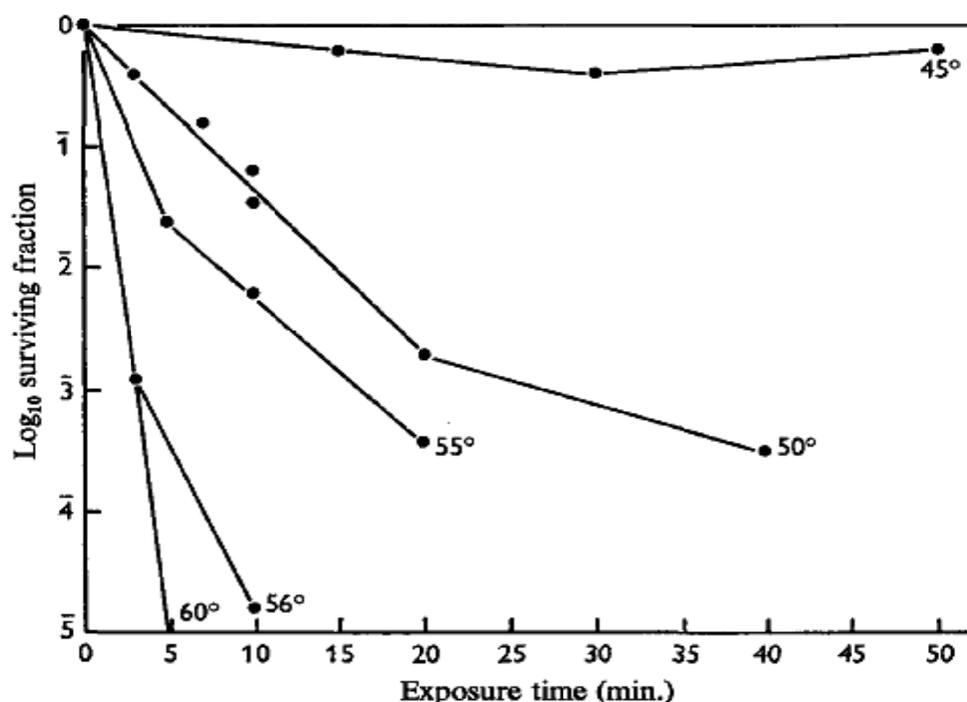


Fig 6 : Inactivation thermique du virus rabique (Turner et Kaplan, 1967)

Le virus est stable à 37°C pendant 2 heures (**Turner et Kaplan, 1967**), il perd 90% de son infectivité après 4 à 6 heures et plus de 99,9% après 24 heures. Des traces de virus viables ont été retrouvées après 5 minutes à 60°C mais l'inactivation est complète après 10 minutes.

### 3.2. Le pH

Le pH a une action virulicide sur le virus rabique, cette action est plus marquée par l'acidité que par l'alcalinité (**Lepine et Gamet, 1969**). En commun avec quelques autres virus, le virus rabique partiellement purifié mis entre 0°C et 4°C est stable à des valeurs de pH entre 5 et 10 (**Turner et Kaplan, 1967**). Il est inactivé à pH 3 et 3,5 en une demi-heure alors qu'entre pH 5 et pH 10 il est encore virulent après 24 heures (**Kuwert et Liepenow, 1959**). Le pH optimal pour la conservation du virus oscille entre 6,4 et 7,0 (**Koldajew et Pikul, 1934**).

Au niveau cellulaire, le pH joue un rôle très important, puisque la fusion du virus rabique avec la membrane cellulaire nécessite pour se faire des valeurs de pH relativement basses (6,2- 6,7) (**Gaudin et al., 1995**).

Sous l'effet de ces différents facteurs (température, pH) et ceux cités précédemment dans les généralités (UV, solvants organiques), la forme native de la particule virale peut présenter des altérations structurales qui peuvent nuire à sa forme active :

## 4. Processus de dégradation de l'antigène vaccinal

Les vaccins restent une classe très instables et vulnérables « ingrédients actifs » dans les préparations biologiques. Le problème est dû partiellement à leur structure complexe, faite de protéines, d'acides nucléiques, de lipides et d'hydrates de carbones. L'exposition au chauffage est la source la plus importante de dommage vaccinal.

**Woese (1960)** suggère qu'à haute température, l'inactivation thermique des virus peut être due à la dénaturation de l'acide nucléique comme à la dénaturation des protéines. **Abdul-Fattah et collaborateurs (2007)** apportent qu'un changement dans la conformation des protéines virales, ou bien un changement de la structure des lipides constituant l'enveloppe virale, peut affecter la stabilité du vaccin in process et durant le stockage.

**Watkinson et Duchars (2010)** indiquent que la dégradation des protéines vaccinales peut impliquer une instabilité chimique (par exemple : lors de formation ou la rupture de liaisons, il en résulte une nouvelle structure antigénique) ou une instabilité physique (changement dans

l'ordre de la structure de la protéine), suite à un processus de dénaturation ou d'agrégation (Amorij et al., 2008), l'instabilité chimique peut résulter de réactions chimiques qui casse les chaînes des acides aminés des protéines ou sert de modification d'un ou plusieurs groupes des acides aminés présent dans la protéine (Watkinson et Duchars, 2010). Des formes d'altérations qui portent sur la perte de la conformation correcte des spicules, ou encore les phénomènes d'hydrolyse et d'oxydation, en sont d'autres exemples de dégradation des antigènes vaccinaux (Amorij et al., 2008). Des solutions ont été apportées pour résoudre ce problème.

## **5. Les méthodes de conservation de l'antigène vaccinal**

Du fait de leur distribution à travers le monde ainsi que la diversité des températures ambiantes, il est important de stabiliser les vaccins pour le transport et le stockage. La stabilité d'un vaccin a évoluée à partir d'un certain nombre de principes pharmaceutiques, et diverses méthodes de stabilisation ont été utilisés par le passé. Les principes et les substances ayant des fonctions stabilisantes prouvées vis-à-vis des antigènes vaccinaux comportent :

### **5.1. Les formes pharmaceutiques**

Deux principaux moyens sont couramment utilisés pour assurer une bonne conservation des vaccins :

#### **5.1.1. La lyophilisation**

Pour conférer aux vaccins la thermostabilité indispensable au maintien de l'intégrité de leur pouvoir vaccinant, il a été proposé de les présenter sous forme solide. Ces vaccins lyophilisés peuvent garder leur stabilité pour des mois ou quelques années à température ambiante. Cependant, il existe l'inconvénient d'exposer les protéines et l'adjuvant du vaccin aux stresses (dénaturation et agrégation) pendant la phase de lyophilisation, cette méthode n'assure tout de même pas une stabilité totale (Wolff et al., 2009).

#### **5.1.2. Les basses températures**

Dans le but d'assurer la stabilité et l'infectivité durant le stockage, les stocks de suspensions de virus infectieux ont communément été conservés à températures ultra-basses ( $\leq -60^{\circ}\text{C}$ ). Dans tous les cas, les virus sous forme liquide doivent être conservés à  $-70^{\circ}\text{C}$

(Chen *et al.*, 2008). Mais ceci n'est pas toujours le cas dans les pays pauvres où la plus part du temps ce matériel fait défaut ou s'il existe il est mal entretenu.

Toute fois, même en les soumettant à ces contraintes de stockage extrêmement drastique, l'intégrité du vaccin pourrait être compromise. D'autres alternatives ont été donc proposées et adoptées dans les préparations de vaccins, afin de les protéger contre d'éventuelles dégradations :

## 5.2. Les formulations vaccinales

La thermostabilité d'un vaccin donné, dépend des propriétés individuelles du virus, du système de culture sur le quel il pousse, et de l'excipient dans lequel il est stocké (Ikizler et Wright, 2002). Utilisés séparément ou en combinaison : les systèmes tampon, la sérum albumine humaine (HSA) ou l'albumine humaine de recombinaison (rHA), la sérum albumine bovine, (SAB), la gélatine, les ions, le sorbitol, les sucres, le thiomersal, le tween 80, l'urée, la Vitamine E succinate, sont utilisés dans les vaccins pour assurer leur stabilité durant de longues périodes (Pfleiderer, 2009).

## 6. Les stabilisants

### 6.1. La stabilité d'un antigène vaccinal

La stabilité des vaccins viraux est déterminée par le taux de perte de l'intégrité de l'antigène viral durant la conservation ou le stockage. Pour les vaccins à virus vivants la stabilité équivaut à la préservation des titres infectieux. Pour ce qui est des vaccins à virus inactivés et sub-unitaires la préservation de la structure antigénique et la présentation stérique correcte des épitopes, sont les paramètres qui déterminent leurs stabilité (Peetermans, 1996).

Comme nous l'avons vue dans le chapitre I, la température de conservation conditionne le taux de dégradation d'un vaccin : plus elle est élevée plus la dégradation est rapide et forte.

Le temps pendant lequel le vaccin est conservé à une température donnée et son activité initiale interviennent également dans la stabilité du vaccin (Galazka *et al.*, 1998).

### 6.2. Définition d'un stabilisant vaccinal

Ce sont des composés chimiques et/ou biologiques que l'on peut ajouter aux vaccins à différent stade de leur préparation en vue de maintenir un niveau d'efficacité maximum lors d'utilisation, qui peut parfois avoir lieu plusieurs années après le début du stockage (Fanget

**et Francon, 2001**). Ce milieu sert à préserver le pouvoir infectant des virus vivants pendant la congélation et la conservation, et aussi à stabiliser le pouvoir antigénique des virus inactivés au cours de la lyophilisation et de la conservation ultérieure du vaccin cryo-desséché (**Kaplan et Koprowski, 1974**). La mise en contact des virus avec l'agent stabilisant peut être effectuée avant, pendant ou après la récolte du virus destiné à la production du vaccin. La mise en contact sera avantageusement effectuée avant la récolte (**Fanget et Francon, 2001**).

Donc, le but final d'un produit stabilisant est de maintenir l'activité et l'immunogénicité de la particule virale (**Grainger, 2007**).

### **6.3. Composition globale d'une solution stabilisante**

Pour prévenir la dégradation de l'antigène et améliorer ainsi la stabilité des vaccins, certains additifs ont été étudiés et des formulations réussies ont été employées par les fabricants (**Monath, 1996**), qui utilisent des sucres, des polyols, et des protéines (**Oberreither et al., 2010**). Associés au stabilisant, les phosphates et les bicarbonates : le sodium phosphate, potassium phosphate, sodium glutamate et le potassium bicarbonate, sont utilisés pour ajuster le pH du vaccin (**Reynolds et Izard, 2005**).

### **6.4. Les différents types d'agents stabilisants utilisés dans les préparations vaccinales**

Les stabilisants sont classés en deux types de produits : inorganiques et organiques :

#### **6.4.1. Les produits inorganiques**

Les ions inorganiques, constituent un composant indispensable des tampons et de l'environnement natif des acides nucléiques. Parmi ceux là, on retrouve les cations dont les plus importants physiologiquement sont : le Magnésium bivalent, le Sodium et le Potassium monovalent (**Kurz, 2008**). Ils participent à la stabilité de la structure des acides nucléiques. Ces éléments peuvent être utilisés séparément sous forme d'ions, ou en complément sous forme de sels :

##### **6.4.1.1. Les ions**

Il a été démontré que l'addition d'ions métalliques au milieu de suspension de certaines préparations virales (virus de la vaccine) les rendent plus résistants à la température, les métaux monovalents sont plus efficaces que les divalents, mais le mélange des deux est plus efficace (**Kaplan, 1968**).

Une variété de cations divalents a été examinée, incluant le Magnésium, le Calcium et le Zinc, mais aucun ne s'est révélé efficace dans l'amélioration de la stabilité du vaccin de la rougeole durant le stockage, cependant la combinaison du Calcium et du Zinc résulte en une amélioration de la stabilité après deux semaines de stockage à 37°C (**Ohtake et al., 2010**). Des formulations contenant du  $\text{Ca}^{2+}$  et/ou du  $\text{Zn}^{2+}$  semblent inhiber l'inactivation du rotavirus à 37°C (**Truong-Le et al., 2010**).

#### **6.4.1.2. Les sels**

Les sels, tel que le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , le  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , le  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , ou le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , ont été utilisés comme agents stabilisants dans certains vaccins à virus vivants (**Burke et Volkin, 2001**). Le  $\text{MgCl}_2$  entraîne une thermostabilisation du virus polio (**Ferreira et al., 2009**). Aussi, le  $\text{MgSO}_4$  entraîne un effet stabilisant sur les Myxovirus, mais pas sur le virus de la stomatite vésiculeuse (**Wallis et al., 1965**). Il a été rapporté par (**Stinchcombe et al., 2008**) que l'incubation du flavivirus pendant 24 heures à 37°C dans le tampon PBS en l'absence d'agents stabilisants, engendre une perte complète du titre viral.

#### **6.4.2. Les produits organiques**

##### **6.4.2.1. Les sucres**

Au cours des 20 dernières années, il a été démontré que les sucres (saccharose et tréhalose) stabilisent les membranes et les protéines à l'état lyophilisé (**Crowe et al., 1998**).

##### ➤ **Le saccharose**

**Sood et collaborateurs (1993)** apportent que le saccharose a du moins un effet stabilisant du vaccin de la fièvre jaune, il induit un faible effet stabilisant du virus influenza (**Ikizler et Wright, 2002**). Pour étudier l'effet stabilisant du saccharose sur le titre du virus de la Peste des petits ruminants dans le vaccin, des milieux stabilisants ont été utilisés. Avec le saccharose à la concentration de 5%, le vaccin a gardé un titre constant pendant plusieurs mois (**Asim et al., 2008**).

##### ➤ **Le tréhalose**

Le tréhalose a gagné une position remarquable par rapport aux autres sucres. Ces propriétés physicochimiques sont plus intéressantes que celle du sucrose ou le dextran,

notamment comme antiagrégant protéique (**Barreca et al., 2010**). Il protège celles-ci lorsqu'elles sont soumises à des températures élevées utilisées lors d'opérations de séchage ou de lyophilisation (**Graf et Cartier, 2003**). Il est utilisé pour la stabilisation des biomolécules (**Jain et Roy, 2008**). Parmi ces applications la plus intéressante est la stabilisation des vaccins durant le stockage à température ambiante (**Schiraldi et al., 2002**).

#### 6.4.2.2. Les polyols

Ceux les plus utilisés sont le sorbitol et le mannitol :

##### ➤ Le sorbitol

Le sorbitol ou glucitol est un polyol (sucre-alcool : il contient des groupes alcool) naturel au pouvoir sucrant deux fois plus faible que le saccharose. Evalué aux concentrations de 1%, 2%, 3%, 4% et 5%, pour développer un vaccin antisalmonellique, il a entraîné un effet stabilisant avec une plus faible perte du titre infectieux à la concentration de 4% à 55°C après 48heures (**Barbour et al., 2002**). Cependant, (**Stinchcombe et al., 2008**) apportent qu'une utilisation de sorbitol préparé dans le tampon PBS aux concentrations de 5% ,10 % et 15%, ne donne pas d'effet stabilisant sur le flavivirus après incubation à 37°C pendant 24heures. Dans une autre étude faite par (**Toriniwa et Komiya, 2008**) la combinaison de 1% de sorbitol et de 0,5% de glycine, révéla une plus grande immunogénicité du vaccin de l'encéphalite japonaise après un an de conservation.

##### ➤ Le mannitol

Comme le sorbitol et autres polyols (xylitol, inositol), le mannitol est utilisé comme excipient pharmaceutique et additif en industrie alimentaire. Cependant le sorbitol est meilleur excipient que le mannitol et le xylitol (**Duflot et al., 2009**).

#### 6.4.2.3. Les acides aminés

Des acides aminés tel que l'acide glutamique, acide aspartique, l'arginine et la lysine, sont usuellement utilisés dans les vaccins comme stabilisants (**Liu et al., 2005**).

#### 6.4.2.4. Les protéines

Des substances d'origine humaine ou animale sont utilisées comme stabilisants dans les préparations vaccinales :

➤ **La gélatine**

C'est une protéine issue de l'hydrolyse partielle du collagène contenu dans les tissus conjonctifs. Elle possède de nombreuses applications dans le domaine culinaire, de la médecine ou de l'industrie. Elle est très utilisée comme stabilisant dans les préparations de nombreux vaccins viraux (**Liu et al., 2005, Vellom et al., 2010**).

➤ **La sérum albumine**

Comme alternatif aux produits dérivés de la gélatine, des produits dérivés du plasma humain (La sérum albumine humaine), ou animal (La sérum albumine bovine), sont utilisés essentiellement comme additif dans les milieux de culture notamment pour le virus rabique (**Costa et al., 2007**). Ces produits ont été communément utilisés comme stabilisants dans la production de vaccins viraux (**Burke et Volkin, 2001, Vellom et al., 2010**).

➤ **L'hydrolysate de lactalbumine**

C'est un peptone (issu d'une réaction d'hydrolyse de protéines), obtenu par la digestion enzymatique ou l'hydrolyse chimique des protéines du lait (la lactalbumine). Il est également très utilisé comme supplément dans les milieux de cultures tissulaires pour le virus rabique (**Lawson et al., 1987**) et celui de la clavelée. Il apporte aux milieux des acides aminés et des peptides. Ces propriétés autant qu'agent stabilisant dans le vaccin ont été étudiés par (**Adebayo et al., 1998**), sur le virus de la fièvre jaune. Après son incorporation dans le vaccin à la concentration de 5%, celui-ci a montré une bonne stabilité après 28j à 37°C.

### **6.5. Mode d'action d'un agent stabilisant**

Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer le rôle protecteur des produits stabilisants.

Pour rester antigéniquement actives, les formulations de protéines doivent préserver l'intégrité de la conformation de la protéine représentant la structure antigénique de base dans le vaccin (**Watkinson et Duchars, 2010**). La structure de n'importe quelle protéine et sa stabilité, sont basées sur les interactions non covalentes telles que les forces hydrophobiques, les interactions de Van der Waals, les liaisons d'hydrogènes, et les interactions ioniques (**Krenn et al., 2010**).

L'influence des ions inorganiques sur les acides nucléiques, spécialement l'ARN et leur structure a été résumée récemment par **Draper** en **2005**. Les cations, tel que le Magnésium bivalent, le Sodium et Potassium monovalent, se lient au Phosphate des acides nucléiques et induisent une réduction des forces répulsives entre les deux brins (**Kurz, 2008**).

**Kaplan (1968)** suggère que l'effet protecteur est probablement dû à la formation des complexes métalloprotéines avec l'augmentation de la résistance à la dénaturation thermique. L'eau (H<sub>2</sub>O) peut spécifiquement altérer l'activité des enzymes de dégradations protéolytique (**Ikizler et Wright, 2002**), parallèlement, l'effet protecteur du sérum peut être attribué à l'action d'enzymes inhibiteurs présents dans le sérum (**Turner et Kaplan, 1967**).

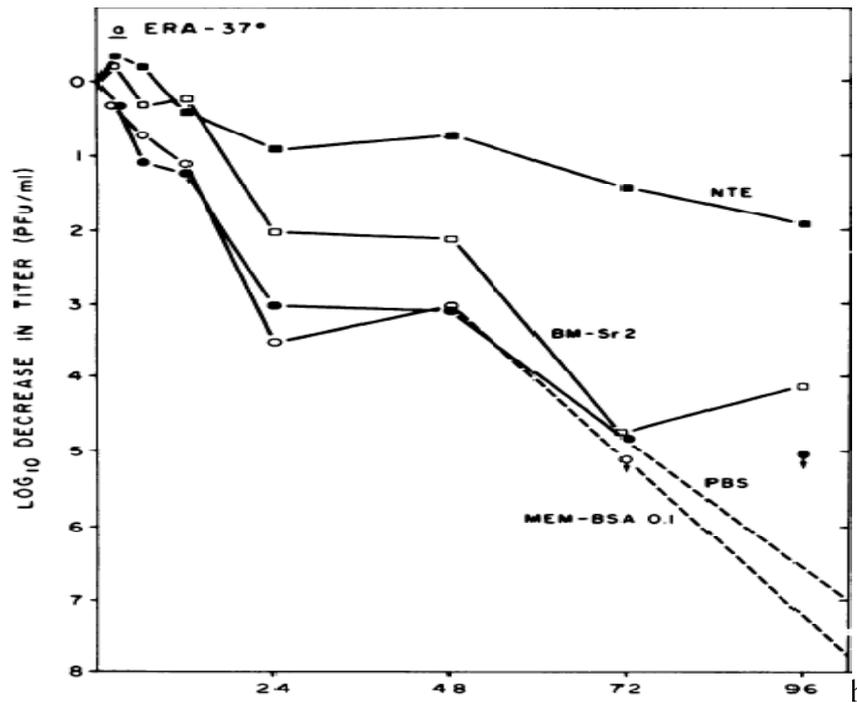
Selon (**Barbour et al., 2002**), les liaisons hydrogènes joueraient un rôle dans la détermination et la stabilisation de la structure tridimensionnelle des polypeptides. Ainsi, un grand nombre d'acides aminés ont des groupes fonctionnels, qui sont de bons donneurs de liaisons hydrogènes, exemple : le groupe hydroxyle (-OH). L'effet protecteur pourrait s'expliquer par une substitution des molécules d'eau par des molécules telles les disaccharides et les carbohydrates qui vont également finir par former des liaisons hydrogènes (**Zhang et al., 2007, Edward et Slater, 2008**).

Ceci abouti à une stabilisation de l'ARN dans la capsid virale, ou bien à un renforcement des structures ARN-capsid hydrogènes (**Newman et al., 1995**).

## **7. La stabilité du virus rabique en milieux stabilisants**

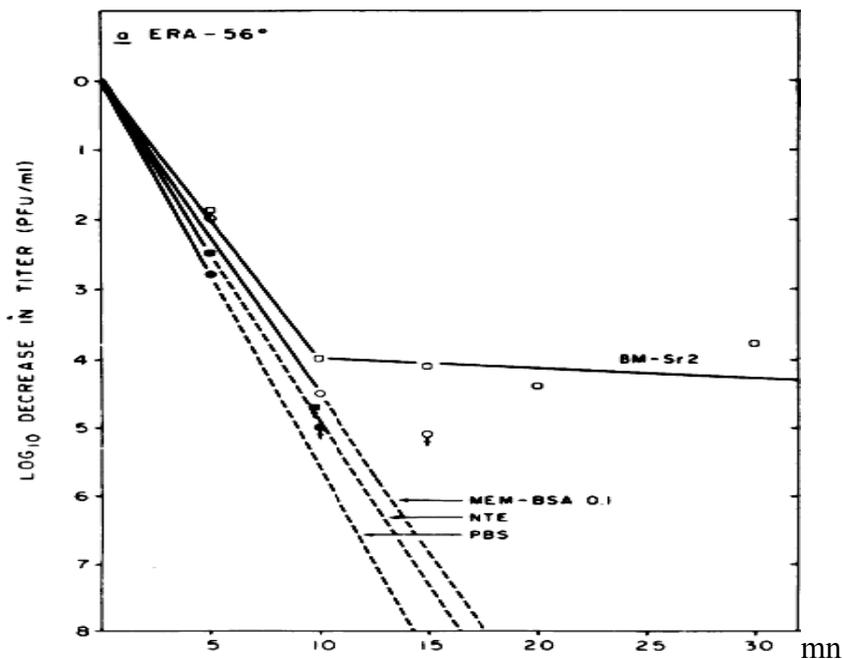
Comme il est de pratique courante de maintenir le virus rabique entre 0°C et 4°C durant la manipulation, en suspension dans un milieu il est aussi important d'incorporer des agents protecteurs telque le sérum (**Mobest, 1959**).

La thermostabilité du virus rabique utilisant plusieurs souches : ERA, PM, Lagos-bat, Mokola, cultivées sur des monocouches de cellules BHK-21, a été étudiée dans une variété de milieux stabilisants (milieu de culture cellulaire supplémenté de protéines, solution tampon). L'effet du milieu stabilisant sur le taux d'inactivation thermique du virus rabique à 37°C et à 56°C a été illustré dans les figures 7 et 8.



**Fig 7 : Inactivation thermique du virus rabique à 37°C dans le : PBS, MEM 0,1%BSA, NTE, BM-Sr2 (Michalski et al., 1976)**

A 37°C le virus rabique est plus efficacement protégé contre l'inactivation thermique par le tampon NTE qui est un mélange de (Nacl, Tris, EDTA), que par le tampon PBS et les autres milieux contenant des protéines



**Fig 8 : Inactivation thermique du virus rabique à 56°C dans le : PBS, MEM-0,1%BSA, NTE, BM-Sr2 (Michalski et al., 1976)**

Inversement, l'effet de ces milieux stabilisants sur le virus été remarquablement différents à 56°C. A cette température, le virus rabique est protégé plus efficacement par les milieux contenant des protéines (MEM-BSA, BM-Sr2) que par le NTE ou le PBS (Michalski et al., 1976).

D'autres études pour déterminer la stabilité de l'antigène rabique ont été réalisées sur le produit fini (vaccin), mais la plupart ne montrent pas la nature et la préparation du stabilisant utilisé.

Le vaccin antirabique préparé avec la gélatine présente une meilleure stabilité (Majer et al., 1976).

L'OMS (1988) a chargé son centre collaborateur de recherche sur la rage, de mener une étude sur la stabilité de préparations vaccinales différant par la composition des milieux stabilisateurs, trois formules ont été élaborées en fonction de l'effet protecteur connu de certains sucres et acides aminés sur des suspensions de virus à ARN enveloppés (Tableau 2) :

**Tableau 2 : Composition des milieux stabilisants en pourcentage (%) (OMS, 1988)**

	A	B	C	D
Glycocolle	0,13	0,13	0,13	0,13
Histidine	0,15	0,15	0,15	0,15
Arginine	0,04	0,04	0,04	0,04
Alanine	0,07	0,07	0,07	0,07
Dextran 20.000	0,22	0,22	0,22	0,22
Lactose	1,0	1,0	-	-
Sorbitol	0,55	0,55	-	-
Albumine bovine	7,5	-	7,5	-
Albumine humaine	-	-	-	7,5
Saccharose	2,5	3,6	3,6	3,6

Un diluant approprié constitué d'un mélange de : NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, a été utilisé pour la préparation de ces milieux stabilisateurs.

Les trois formules de stabilisants sont efficaces, cependant le stabilisant B qui ne nécessite pas une surcharge en protéines, reste de part son prix de revient inférieur et ça facilité de fabrication, la préparation de choix pour la production de vaccins antirabiques inactivés, liquides et adjuvés.

## **Partie pratique**

### **Lieu de l'étude**

L'étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de virologie du service rage : Production de Vaccins et Sérum Antirabique - Institut Pasteur d'Algérie - Annexe de Kouba (IPK), durant la période allant du 01/12/2009 au 30/04/2011.

### **Objectif de l'étude**

- Notre travail a été porté sur l'étude de la thermostabilité du virus rabique vivant ERA/SAD produit sur cultures de cellules Vero, support de production du vaccin antirabique à usage vétérinaire en Algérie. Il comporte l'essai de produits dits stabilisants et protecteurs pour cet agent à savoir : le saccharose (utilisé à l'IPK comme excipient de lyophilisation pour le vaccin antirabique à usage médical), le tampon ENDERS (utilisé à l'IPK pour la préparation du vaccin antirabique à usage médical), le sorbitol et le tampon PBS qui ne sont pas utilisés à l'IPK dans la production de vaccins antirabiques. Et cela dans le but de les utiliser pour améliorer la stabilité et donc l'efficacité du vaccin antirabique produit en Algérie.

- Après production du virus rabique sur culture cellulaire et récolte des surnageants viraux, nous procédons au mélange de ce surnageant (virus) avec le produit dit stabilisant aux concentrations choisies. Ces mélanges seront soumis à un test de stabilité accéléré (inactivation thermique à 37°C pendant 7j). Ensuite, nous effectuons une évaluation du titre du virus rabique contenu dans la solution stabilisante pour les différents produits testés par la méthode *in vivo* et nous réalisons ensuite le calcul du titre viral par la méthode de Spearman-Kärber.

- Nous effectuons enfin, une comparaison des titres du virus rabique obtenus par cette méthode de calcul, entre les différents produits testés, afin de déterminer la meilleure formulation stabilisante avec le plus d'effet protecteur pour le virus rabique ERA/Vero.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Matériel

#### 1.1.1. Matériel biologique

##### Les cellules Vero

La lignée cellulaire Vero a démarrée en 1962 à partir d'une culture primaire de cellules épithéliales de rein de vervet « *Cercopithecus aethiops* » (singe vert). Après plusieurs passages, la lignée cellulaire a été transférée à l'American Type Culture Collection (ATCC) et une banque de cellules primaires (BCP) a été créée, à partir d'une ampoule de cellules obtenues lors du 121<sup>e</sup> passage. Cette BCP a été utilisée pour préparer les banques de cellules de travail de plusieurs fabricants. Les cellules Vero sont des cellules aneuploïdes, à faible caractère tumorigène, et une facilité d'adaptation en culture sur certains systèmes (Microcarrier) et la production ainsi de plus grandes quantités de virus (Sheets, 2000). Ces cellules sont conservées dans de l'azote liquide à -170°C, les containers sont entreposés dans une chambre froide.

##### Le virus de semence (SLT)

La production de vaccin est basée sur le système des lots de semence (SLT), celui-ci est appliqué sous forme d'une réserve de suspension virale homogène stockée à très basse température en ampoules scellées. Cette souche est strictement contrôlée, en particulier du point de vue pureté et identité. Le SLT doit être soumis à des épreuves de stérilités et conservé à -70°C.

##### ➤ La souche ERA

La souche ERA (Evelyn-Rokitnicki-Abelseth) du virus rabique, dérive du virus fixe SAD (Street Alabama Dufferin). A l'origine elle a été isolée d'un chien enragé et propagée sur cerveau de souris (Fehlner-Gardiner et al., 2008), puis Paul Fenje en 1960 a fait cultivé et adapté cette souche sur cellules rénales de hamster, ensuite, Abelseth en 1964 a réalisé plusieurs passages de la souche sur embryons de poulet puis sur cellules rénales de porcs. La souche ERA du virus rabique est utilisée à l'Institut Pasteur d'Algérie comme souche productrice du vaccin antirabique vivant atténué (Vet era) à usage vétérinaire (Chiens, chats, bovins, ovins) (Brahimi et al., 2010).

## Les animaux

Nous avons utilisé des souris blanches albinos (la souche Swiss). Nous avons utilisé des souriceaux à la mamelle âgés de 3 à 4j. Les animaux des deux sexes sont également sensibles au virus rabique. Il est indispensable que les animaux choisis pour être inoculés soient en bonne santé. Il est important de connaître les antécédents de l'élevage.

### 1.1.2. Milieu de culture et réactifs

- Antibiotique
- Bouillon au thioglycolate
- Eau distillée
- Milieu de culture cellulaire (DMEM)
- Saccharose
- Sérum de veau fœtal (SVF)
- Sérum normal de cheval (SNC)
- Sorbitol
- Tampon ENDERS
- Tampon PBS
- Trypsine

### 1.1.3. Matériel de laboratoire

- Bain marie
- Chambre froide régulée à +4°C
- Etuves à 30°C et à 37°C
- Fioles de 50ml
- Flacons de roux
- Gants et lunette de protection
- Hotte à flux laminaire
- Microscope inversé
- Congélateur (-20°C,- 70°C)
- Seringues de 1ml
- Tubes à essais et tubes à vis

## 1.2. Méthodes

### 1.2.1. Production du virus rabique ERA sur cellules Vero en mode stationnaire

Les cultures de cellules dispersées dérivant directement de tissus frais sont nommées culture de cellules primaire.

#### ➤ Les lignées de travail

La plupart des cellules des vertébrés meurent après un nombre défini de divisions en culture *in vitro*. Cependant, certaines cellules peuvent être immortalisées en laboratoire par certains procédés (Utilisation de certains virus tel que le SV40). Ces cellules peuvent être propagées à l'infini pour donner une lignée cellulaire. Ces lignées sont obtenues par sous-clonage des cellules, opération qui consiste à isoler une cellule et à la laisser proliférer pour former une importante colonie.

Une lignée cellulaire est donc une population de cellules capables de se diviser un grand nombre de fois en culture tout en conservant leurs principales caractéristiques, et qui servent à la production de grandes quantités de vaccin.

La culture cellulaire ne peut se faire que dans un local prévu pour l'entretien des cellules, elle se base sur l'utilisation d'outils, que sont :

- ✓ Un endroit stérile comportant une hotte à flux laminaire, une source d'UV, accès par SAS.
- ✓ Un endroit remplissant les conditions nécessaires à la vie des cellules : un incubateur.
- ✓ Du milieu de culture (DMEM) (**Annexe II**).

Pour la réalisation de l'essai, le virus vivant de la rage a été produit sur culture cellulaire, en faisant multiplier la souche de virus rabique ERA/SAD sur cellules Vero, réalisé en mode stationnaire (Boîtes de roux) sur système clos (**Kaplan et Koprowski, 1974**).

Des décongélations d'une ou de plusieurs ampoules de cellules ont été réalisées. L'ampoule contient des cellules dans un milieu de culture adapté, plus un agent cryo-protecteur, puis on rajoute du milieu de culture adapté. Enfin, les cellules sont remises à incuber pendant 3j pour obtenir une monocouche cellulaire uniforme (le tapis cellulaire).

La première étape de production du virus rabique sur culture cellulaire consiste en une trypsination des cellules :

### **1.2.1.1. La trypsination des cellules**

#### **a. Principe**

La technique de trypsination permet de détacher le tapis cellulaire de son support et de séparer les cellules les unes des autres à l'aide d'une enzyme (la trypsine). Ces cellules sont réensemencées ensuite sur d'autres flacons stériles en remplaçant le milieu de culture appauvris par un milieu neuf.

Ces manipulations ont pour but une amplification des cellules de manière exponentielle. Ceci constitue un passage ou un repiquage. Ainsi, un tapis cellulaire jeune est obtenu qui peut survivre entre 4 à 6 jours avant d'être à nouveau repiqué ou inoculé.

#### **b. Technique de trypsination**

Les cellules détachées grâce à l'enzyme sont repiquées à raison de 1 boîte pour 2 ou 3. Après avoir éliminé le milieu de culture, verser dans le flacon portant les cellules en nappe une petite quantité de trypsine et laisser agir pendant quelques secondes pour faire détacher les cellules, puis retirer la trypsine. La trypsination est complète lorsque la couche cellulaire apparaît craquelée à la surface du verre ou plastique.

A l'aide d'une pipette graduée quelques ml du milieu de culture DMEM tiédie préalablement au bain marie sont prélevés et versés dans le flacon de façon à mettre les cellules en suspension. Cette suspension cellulaire fraîchement trypsinée est récupérée, répartie en trois nouveaux flacons et mises à incuber à 37°C pendant 24h ensuite transférée à 33°C. Après 24h d'incubation, la prolifération cellulaire est contrôlée grâce au microscope inversé.

### **1.2.1.2. Amplification et propagation du virus rabique sur les cultures de cellules**

L'amplification du virus rabique est nécessaire pour passer de l'ampoule du lot de semence aux milliers de litres de virus qui seront transformés en vaccin. Le titre du virus rabique dans le lot de semence ne doit pas être inférieur à  $10^{6.7}$  DL<sub>50</sub> par ml. La monocouche de cellules est infectée par l'inoculum viral dans le flacon préalablement débarrassé du milieu d'entretien. La quantité d'inoculum viral ajoutée est calculée de façon à obtenir une multiplicité d'infection optimale (M.O.I).

### **a. Préparation du SLT**

Juste avant l'utilisation, une quantité appropriée de virus de semence est décongelée et préparée en réalisant une dilution appropriée du virus de semence dans le PBS (exemple : 1/100), le virus de semence ainsi préparé est mis dans un bain d'eau glacée jusqu'au moment de l'utilisation.

### **b. Infection de couches monocellulaires**

La qualité des cellules au moment de l'infection initiale revêt une importance capitale. Pour pouvoir obtenir un rendement maximum en virus à partir de cultures en monocouches, il est indispensable d'utiliser celles qui sont tout juste confluentes (cellules jeunes). L'infection commence par l'élimination du milieu de culture des flacons renfermant des cellules et le lavage des cellules avec du PBS. Ensuite, à partir de la solution virale de SLT, un inoculum est prélevé (10ml) et mis dans chaque flacon de roux. Le virus est ensuite laissé pour adsorption pendant une 1heure à 1h 30 à 37°C avec agitation de temps à autre puis élimination de l'inoculum après la phase d'adsorption.

Un milieu de propagation viral composé de milieu de base DMEM à 3% de SVF est ajouté à raison de 50ml par boîte de roux, ces boîtes seront incubées 6 jours à 33°C.

#### **1.2.1.3. Le suivi de la culture cellulaire**

Il y a plusieurs contraintes dans la culture de cellules, la première est l'obtention des cellules, la seconde leur maintien en culture. C'est pour cela que l'entretien des cellules doit être mené de manière rigoureuse et constante. La prochaine étape après la trypsination et l'infection des cellules est le suivi de la culture cellulaire qui passe par :

##### **✓ L'environnement durant l'incubation**

Le respect de certains paramètres physico-chimiques nécessaires à la culture cellulaire doit être maintenu : la température (33 -37°C), le pH.

##### **✓ La morphologie des cellules Vero au microscope inversé**

Le microscope inversé permet une meilleure visualisation des prolongements cytoplasmiques et des organites. Les cellules Vero ont un aspect de fibroblastes, fusiformes.

Elles adhèrent rapidement au support de verre ou plastique, formant un tapis de confluence pour une densité de  $10^5$  cellules/cm<sup>2</sup>. La vacuolisation et la présence de cellules

granuleuses, ou arrondies en suspension, indiquent une souffrance cellulaire et la perte d'adhésion.

✓ **L'aspect du milieu de culture**

Limpide et rouge orangé, il doit être sans particules, précipités ou flocons, conservant ses caractéristiques physiques et ses performances.

**1.2.2. Récolte, clarification et contrôle des surnageants contenant le virus rabique**

**a. La récolte du virus rabique**

Au cours de la réplication virale, le milieu de culture est remplacé par un milieu d'entretien (DMEM) avec du sérum à faible pourcentage (environ 3%) et les cultures sont incubées à 33°C.

Les récoltes de virus sont constituées du milieu d'entretien dans lequel les particules virales sont libérées.

Après 6 jours d'incubation à 33°C, une première récolte du virus rabique est effectuée. Le surnageant de chaque flacon de roux contenant les particules virales infectantes, est recueilli dans un flacon maintenu dans un bain d'eau glacé. Deux autres récoltes seront effectuées après la première récolte : une au 8<sup>ème</sup> jour et l'autre au 10<sup>ème</sup> jour d'incubation à 33°C.

**b. La clarification et le contrôle des récoltes virales**

Le liquide recueilli des cultures cellulaires infectées est débarrassé des cellules et des débris cellulaires par centrifugation à froid à faible vitesse (3000 trs/mn pendant 30 mn). Les récoltes clarifiées sont rapidement conservées à -20°C ou à -70°C, pour être utilisées ultérieurement pour la production de vaccins antirabiques. Avant toute utilisation des surnageants deux types de contrôles sont effectués :

- Une épreuve de stérilité (contrôle bactériologique et fongique), 0,5ml du surnageant viral sont mis dans deux tubes à vis contenant 9ml de bouillon au thioglycolate, un tube est incubé pendant 20 jours à 37°C pour la recherche des bactéries aérobies et anaérobies et l'autre tube est incubé pendant 20 jours à température ambiante pour la recherche de champignons. A la lecture, les bouillons doivent être clair, et ne contenant pas de micelles. Les surnageants contaminés sont systématiquement éliminés.

- Une épreuve de détermination du titre initial (**Tableau 11, Annexe I**) par la méthode *in vivo*.

### **1.2.3. Etude de la stabilité du virus rabique ERA/Vero**

Cette partie comprend deux étapes :

- 1) Dans un premier temps la thermostabilité du virus rabique vivant natif, a été étudiée en le soumettant à des conditions de températures drastiques (25°C et 37°C) et sans ajout de produits protecteurs.
- 2) Dans un deuxième temps la thermostabilité du virus rabique vivant a été étudié en présence de produits dits stabilisants. Pour chaque étape, une série de tests a été effectuée.

(Les étapes du protocole expérimental sont schématisées dans la figure14)

#### **1.2.3.1. Etude de la stabilité du virus ERA/Vero sans stabilisants**

Avant utilisation des surnageants récoltés, un échantillon est prélevé pour le contrôle du titre viral par la méthode *in vivo*. A partir des surnageants clarifiés, trois aliquotes seront préparés pour être incubés :

- Un aliquote à +4°C pendant 7 jours
- Un aliquote à 25°C pendant 7 jours
- Un aliquote à 37°C pendant 7 jours

Après incubation le titrage viral est effectué par la méthode *in vivo*.

#### **1.2.3.2. Etude de la stabilité du virus rabique en milieux stabilisants**

##### **a. Préparations des milieux stabilisants**

Des solutions stabilisantes de saccharose à 20% et de sorbitol à 10% ont été préparées en utilisant comme diluant le tampon ENDERS (**Annexe II**). Deux autres solutions de sorbitol ont été préparées à la concentration de 40%, une avec le tampon PBS (**Annexe II**) et l'autre avec l'eau distillée.

##### **b. Préparation des mélanges virus rabique / stabilisant**

###### **➤ Etude de la stabilité du virus ERA/Vero dans le tampon ENDERS**

Dans une fiole, 20ml de surnagent viral est mélangé avec 2ml de tampon ENDERS, après agitation douce pendant 30mn à +4°C, le mélange sera incubé à 37°C pendant 7j.

➤ **Etude de la stabilité du virus ERA /Vero dans le tampon PBS**

Le surnageant viral (18ml) auquel est rajouté 2ml de tampon PBS, est soumis à une agitation douce pendant 30mn à +4°C, puis incubé à 37°C pendant 7j.

➤ **Etude de la stabilité du virus ERA/Vero dans la solution ENDERS/Saccharose**

Un volume de 20ml de surnageant viral est mélangé avec 2ml de la solution de saccharose à 20% avec agitation douce pendant 30mn à +4°C, le mélange sera ensuite incubé à 37°C pendant 7j.

➤ **Etude de la stabilité du virus ERA/Vero dans la solution ENDERS/Sorbitol**

Le surnageant viral (20ml) est mélangé avec 2ml de la solution de sorbitol à 10%, puis une agitation douce pendant 30 mn à +4°C est faite et le mélange sera incubé à 37°C pendant 7j.

➤ **Etude de la stabilité du virus ERA/Vero dans la solution PBS/Sorbitol**

Le surnageant viral (18ml) auquel est rajouté 2ml de la solution stabilisante de sorbitol à 40% sera agité pendant 30mn à +4°C. Le mélange sera ensuite incubé à 37°C pendant 7j.

➤ **Etude de la stabilité du virus ERA/Vero dans la solution Eau distillée/Sorbitol**

De la même façon précédente, le mélange de 18ml de surnageant viral avec 2ml de solution de sorbitol à 40% est réalisé, puis une agitation douce pendant 30mn à +4°C et le mélange sera incubé à 37°C pendant 7j.



**Fig 9 : Incubation des mélanges virus rabique/stabilisant à 37°C (Photo personnelle)**

Après préparation, agitation et incubation des mélanges de virus rabique avec les milieux stabilisants (**Fig 9**) pendant 7j à 37°C dans la salle de culture cellulaire, le titrage des différentes solutions contenant le virus rabique par la technique d'inoculation du virus rabique à des souriceaux à la mamelle est réalisé dans la salle des contrôles.

#### 1.2.4. Appréciation du titre du virus rabique par inoculation aux souriceaux

Malgré sa simplicité, l'étape d'inoculation doit être exécutée avec beaucoup de précision pour donner des résultats fiables.

##### ➤ Principe

Elle consiste en l'inoculation par la voie intracérébrale à des souriceaux à la mamelle de dilutions sériées d'une suspension virale. Ce test permet d'évaluer le nombre de particules infectieuses par unité de volume en calculant la DL<sub>50</sub> (dose létale capable de tuer 50% des animaux inoculés) (**Meslin et al., 1999**).

##### 1.2.4.1. Préparation des dilutions virales

Le diluant est constitué par une solution stérile d'eau bi distillée à la quelle est incorporé du SNC et un antibiotique. Le virus à titré, sera mélangé au diluant stérile de manière à obtenir les différentes dilutions (**Fig 10, Tableau 3**).

**Tableau 3 : Les dilutions réalisées lors du titrage de la suspension virale**

Tube N°	Volume de diluant /ml	Volume de virus Transféré /ml	Dilution obtenue
1	4,5	0,5	10 <sup>-1</sup>
2	4,5	0,5	10 <sup>-2</sup>
3	4,5	0,5	10 <sup>-3</sup>
4	4,5	0,5	10 <sup>-4</sup>
5	4,5	0,5	10 <sup>-5</sup>
6	4,5	0,5	10 <sup>-6</sup>
7	4,5	0,5	10 <sup>-7</sup>



**Fig 10 : Préparation des dilutions de virus rabique (Photos personnelle)**

Placer les tubes à essais contenant les dilutions désirées dans un bain d'eau glacée. On a le choix de la dilution la plus étendue, mais la dilution la moins étendue doit tuer au moins 80% des souriceaux.

#### **1.2.4.2. L'épreuve d'inoculation intracérébrale aux souriceaux**

A l'aide d'une seringue de 1ml, inoculer par la voie intracérébrale 4 à 6 souriceaux avec 0,02ml de chaque dilution, en passant successivement de la dilution la plus étendue à la moins étendue (**Fig 11**).



**Fig 11 : Inoculation intracérébrale du virus rabique aux souriceaux à la mamelle (Photo personnelle)**

### 1.2.4.3. La lecture

Les animaux sont soumis à une observation quotidienne pendant 16 jours dès le premier jour suivant l'inoculation. Le nombre de souriceaux normaux, paralysés, malades ou morts (**Fig 12,13**) survenant après le quatrième jour d'inoculation, est inscrit sur une fiche d'observation. Les signes suivants devront être notés : des tremblements lorsque l'animal est tenue en l'air par la queue avec des pinces, une incoordination des pattes postérieures (noter la démarche de l'animal lorsqu'on le met sur la table et qu'on le force à se déplacer), ainsi qu'une paralysie et une prostration (agonie).



**Fig 12 : Souriceaux avant inoculation  
en bonne santé**

**Fig 13: Souriceaux paralysés après  
inoculation**

**(Photos personnelles)**

### 1.2.4.4. Le calcul du titre viral par la méthode de Spearman-Kärber

Le titre d'un surnageant viral rabique satisfaisant pour la production d'un vaccin ne sera pas inférieur à  $10^{-4}$  DL<sub>50</sub> pour 0,02ml. Le calcul de la dilution correspondant au point 50% comprend les étapes suivantes :

Etape 1 : Noter le  $\log_{10}$  de l'inverse de la plus faible dilution du virus, celle pour laquelle tous les animaux sont positifs.

Etape 2 : Déterminer la somme des animaux positifs à la dilution définie à l'étape 1 et à toutes les dilutions plus poussées.

Etape 3 : Lire dans le tableau correspondant au facteur de dilution utilisé (10) (**Meslin et al., 1999**) la valeur numérique attribuée au nombre d'animaux positifs déterminés à l'étape 2.

Etape 4 : Additionner les valeurs déterminées dans les étapes 1 et 3. Ce total représente le  $\log_{10}$  de l'inverse de la dilution point 50.

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2007, pour comparer les titres viraux rabiques entre les différents tests, par l'application d'un test statistique Mann Whitney.

La différence est considérée comme significative si la probabilité (p) est inférieur à la valeur 0,05 ( $p < 0,05$ ).

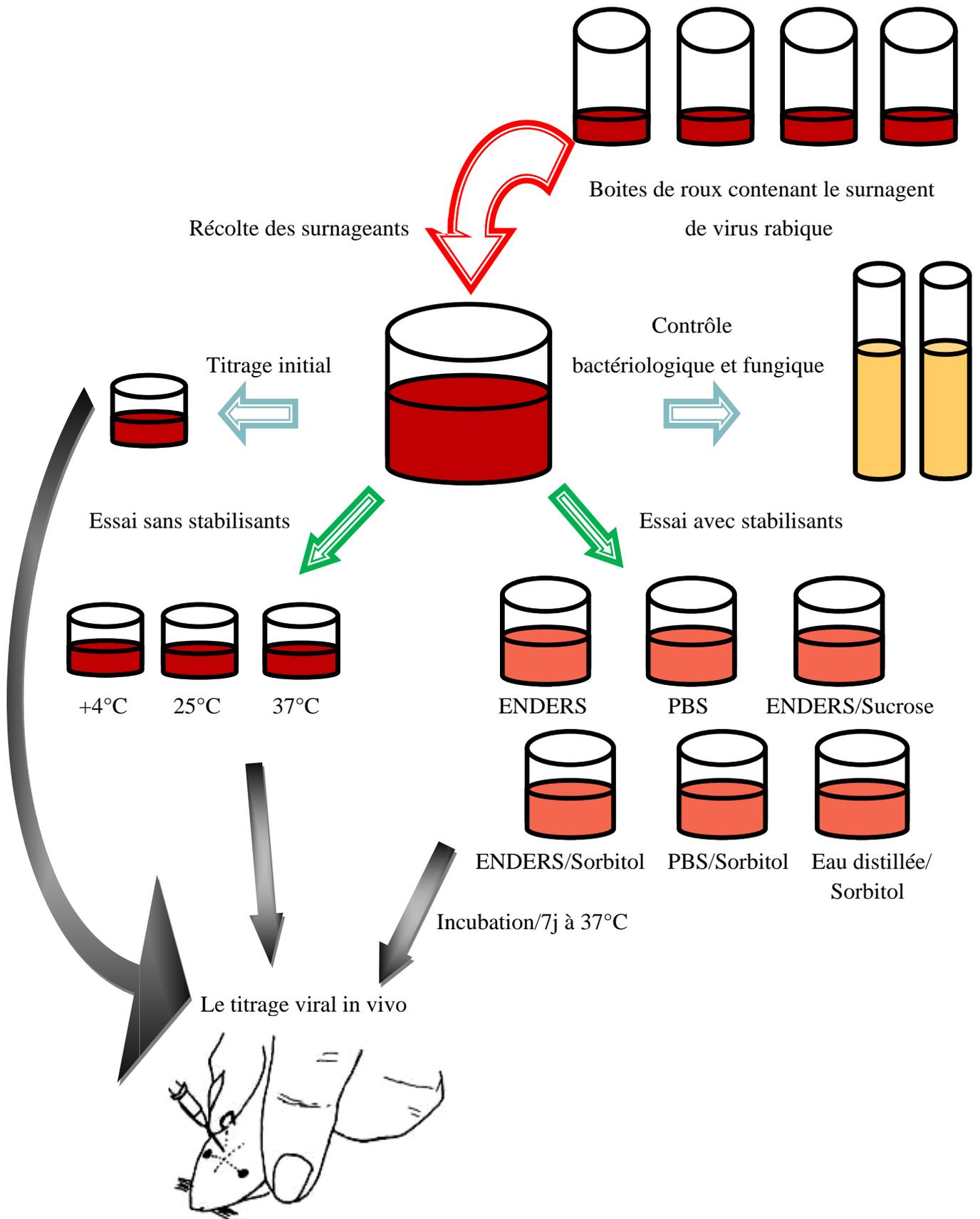


Fig 14 : Représentation schématique du protocole expérimental

## **Résultats**

## 2. RESULTATS ET INTERPRETATION

### 2.1. Etude de la stabilité du virus rabique ERA /Vero sans stabilisants

Dans le présent essai le comportement du virus rabique natif est étudié sans ajout de produits stabilisants après une incubation de 7 jours à 3 températures (**Tableau 4**).

**Tableau 4 : Les titres viraux rabiques (en  $\log_{10}1/DL_{50}$ ) sans ajout de stabilisants**

Test N°	N° de récolte	Titre initial	Titre à +4°C	Titre à 25°C	Titre à 37°C	p
1	EVS 10	5,75	5,00	4,00	2,5	-
2	EVS 12	6,00	5,00	4,25	2,25	-
3	EVS 13	6,50	5,75	4,00	2,50	-
4	EVS 6	6,25	5,00	4,25	2,50	-
5	EVS 6	6,25	5,50	4,25	2,50	-
6	EVS 6	5,75	4,75	3,50	2,25	-
7	EVS 6	6,00	5,25	4,50	2,50	-
	<b>Moyenne (écart-type)</b>	<b>6,07±0,26<sup>a</sup></b>	<b>5,18±0,32<sup>b</sup></b>	<b>4,11±0,29<sup>c</sup></b>	<b>2,43±0,11<sup>d</sup></b>	<b>&lt;0,01</b>
	<b>CV(%)</b>	<b>4,25</b>	<b>6,17</b>	<b>7,17</b>	<b>4,65</b>	

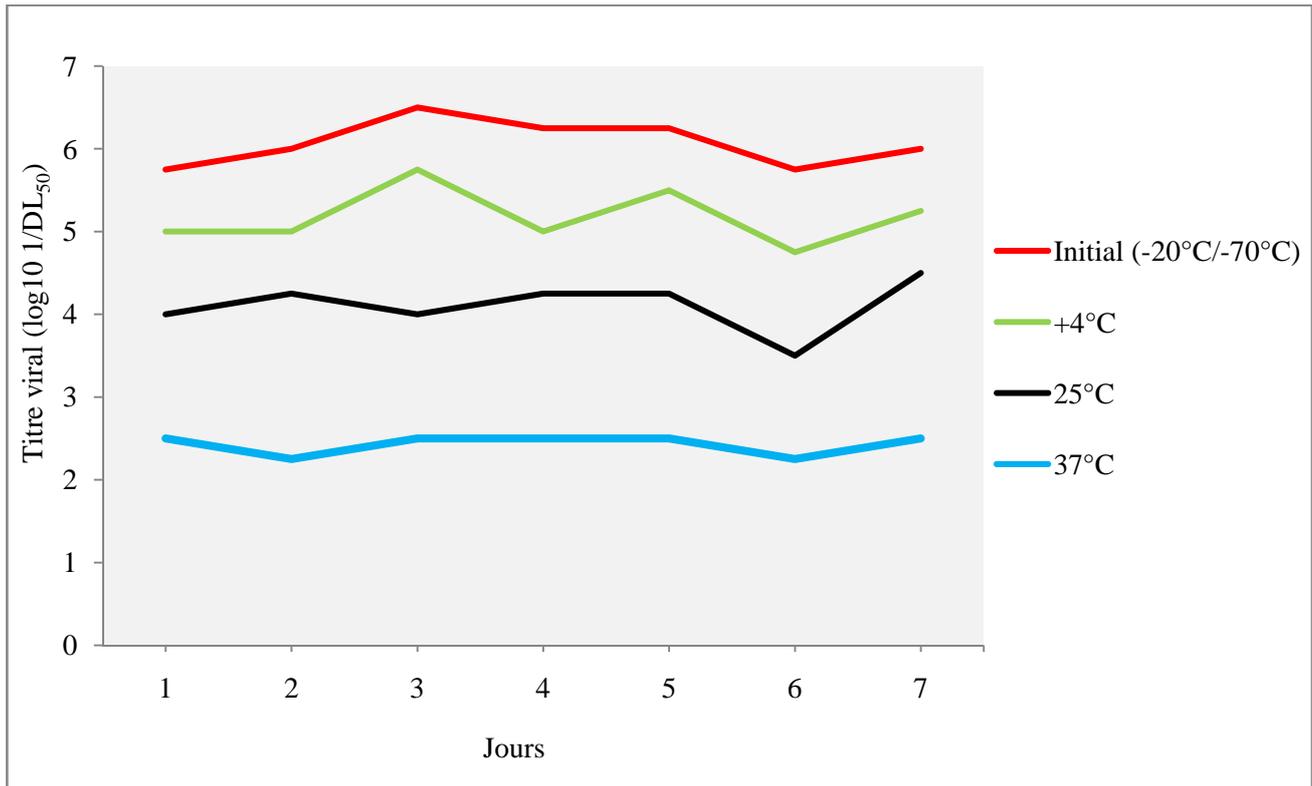
CV : Coefficient de variation

La cinétique d'inactivation thermique du virus rabique ERA /Vero représente une courbe décroissante en fonction de la température d'incubation du virus. Le titre du virus rabique dans le surnageant diminue en allant des basses températures aux fortes températures (**Fig 15**).

Le titre initial (6,07±0,26) du surnageant viral est significativement supérieur ( $p<0,01$ ) au titre du virus rabique après 7 jours d'incubation à +4°C (5,18±0,32), à 25°C (4,11±0,29) et à 37°C (2,43±0,11).

Le titre viral à +4°C (5,18±0,32) est significativement supérieur ( $p<0,01$ ) au titre viral à 25°C (4,11±0,29) et à 37°C (2,43±0,11), après 7 jours d'incubation.

Le titre viral à 25°C (4,11±0,29) est significativement supérieur ( $p<0,01$ ) au titre viral à 37°C (2,43±0,11), après 7 jours d'incubation (**Tableau 4**).



**Fig 15 : Evolution du titre du virus rabique (Moyenne±écart-type) après 7j en fonction de la température d'incubation**

Le calcul de la moyenne du titre viral pour chaque température démontre qu'il y a une perte du titre du virus rabique en allant des faibles températures (-20°C/-70°C et +4°C) aux plus fortes températures (25°C et 37°C).

**Tableau 5 : La perte du titre du virus rabique (en %) après 7j d'incubation à +4°C, 25°C et à 37°C**

Titre viral initial (Moyenne±écart-type)	% de perte +4°C	% de perte 25°C	% de perte 37°C
6,07±0,26	14,71	32,35	60

A basses températures d'incubation (+4°C), une plus faible perte du titre viral est observée (14,71%) par rapport aux plus fortes températures (25°C perte de 32,35% et 37°C perte de 60%) (**Tableau 5**). Le virus se maintient stable après 7j d'incubation à +4°C à un titre important (5,18±0,32) qui se rapproche de celui du virus initial (6,07±0,26).

La perte virale est notable après 7 jours d'incubation à 25°C (32,35%) allant de  $6,07 \pm 0,26$  comme titre initial jusqu'à  $4,11 \pm 0,29$  à 25°C. Mais, cela indique que le virus rabique se maintient après 7 j d'incubation à 25°C puisque le titre viral ( $4,11 \pm 0,29$ ) est proche de celui de +4°C ( $5,18 \pm 0,32$ ). Le pourcentage de particules virales restantes à 25°C le montre aussi.

Cependant, dans le tableau 5, nous constatons que les pertes les plus importantes en titre du virus rabique surviennent aux températures les plus élevées (37°C) après 7 jours d'incubation (60%). Le titre viral chute de façon drastique atteignant la valeur de  $2,43 \pm 0,11$  en le comparant au titre initial ( $6,07 \pm 0,26$ ) et à celui de 25°C ( $4,11 \pm 0,29$ ).

Malgré un séjour de 7j à 37°C, une quantité de particules virales mesurable par la technique de titrage utilisée dans l'essai est retrouvée.

## 2.2. Etude de la stabilité du virus rabique ERA/Vero en milieux stabilisants

Les produits stabilisants, les tampons utilisés et les concentrations correspondantes sont représentés dans le tableau 6 :

**Tableau 6 : Les milieux stabilisants évalués**

<b>Le produit stabilisant utilisé</b>	<b>Le tampon/diluant (véhicule) du produit stabilisant</b>	<b>Concentration finale utilisée du produit stabilisant</b>
Le saccharose	ENDERS	2%
Le sorbitol	ENDERS	1%
	PBS	4%
	Eau distillée	4%

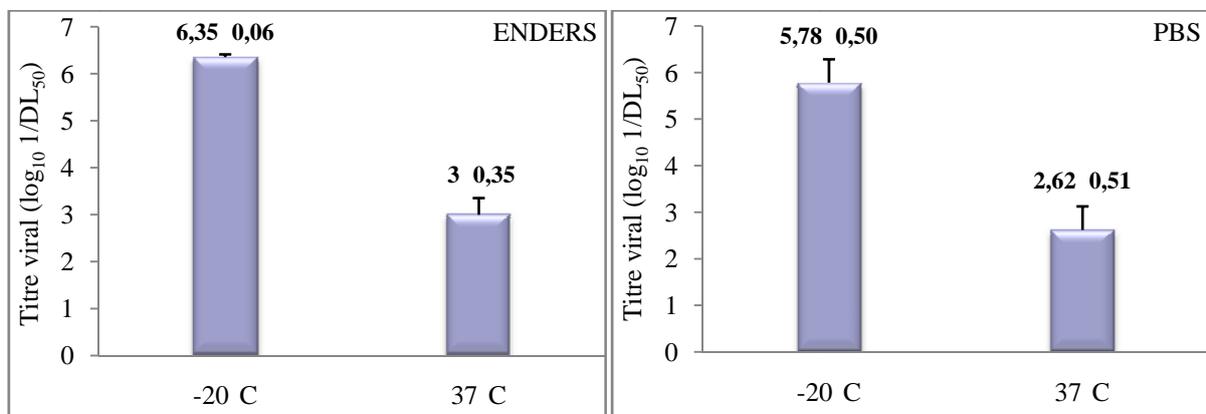
### 2.2.1. Etude de la stabilité du virus ERA/Vero dans le tampon ENDERS et PBS

Dans cet essai la stabilité du virus rabique est étudiée en présence du tampon ENDERS et du tampon PBS après 7j d'incubation à 37°C (Tableau 7)

**Tableau 7 : Les titres viraux rabiques (en  $\log_{10}1/DL_{50}$ ) après incubation dans le tampon ENDERS et le tampon PBS**

Test N°	Titre viral initial	Titre viral : Tampon ENDERS	Titre viral initial	Titre viral : Tampon PBS	p
1	6,50	3,25	5,00	3,83	-
2	6,33	3,5	6,33	2,17	-
3	6,33	2,5	5,50	2,50	-
4	6,33	3	5,50	2,50	-
5	6,33	2,5	5,50	2,50	-
6	6,33	3	6,33	2,33	-
7	6,33	3,25	6,33	2,50	-
<b>Moyenne (écart-type)</b>	<b>6,35±0,06<sup>a</sup></b>	<b>3±0,35<sup>b</sup></b>	<b>5,78±0,50<sup>a</sup></b>	<b>2,62±0,51<sup>b</sup></b>	<b>&lt;0,01</b>
<b>CV(%)</b>	<b>0,94</b>	<b>11,79</b>	<b>8,65</b>	<b>19,41</b>	

Les résultats enregistrés dans le tableau 7, montrent que le titre initial du surnageant viral est significativement supérieur ( $p<0,01$ ) au titre du virus rabique après 7jours d'incubation à 37°C en présence du tampon ENDERS ou du tampon PBS. Le titre du virus rabique diminue de 6,35±0,06 et de 5,78±0,50 (titre initial) jusqu'à 3±0,35 et 2,62±0,51 pour le tampon ENDERS et le tampon PBS respectivement après l'incubation (Fig 16).



**Fig 16 : Evolution du titre du virus rabique (Moyenne±écart-type) après incubation dans le tampon ENDERS et dans le tampon PBS**

L'incubation du virus rabique à 37°C pendant 7j dans le tampon ENDERS induit une perte de 52,79% du titre du virus rabique et d'une perte de 54,73% pour le tampon PBS.

Pour les deux tampons la perte virale est importante, mais ces valeurs indiquent qu'il y a une quantité non négligeable de particules virales qui survie et se maintient en présence du tampon ENDERS (47,21%) ou du tampon PBS (45,27%) après 7j d'incubation à 37°C. Par contre le pourcentage de particules virales restantes dans le tampon ENDERS est plus élevé que celui du tampon PBS.

### 2.2.2. Etude de la stabilité du virus ERA/Vero dans la solution ENDERS/Saccharose et ENDERS/Sorbitol

Dans cet essai la stabilité du virus rabique est étudiée en présence du saccharose à 2% et du sorbitol à 1%, véhiculés par le tampon ENDERS après 7j d'incubation à 37°C (Tableau 8).

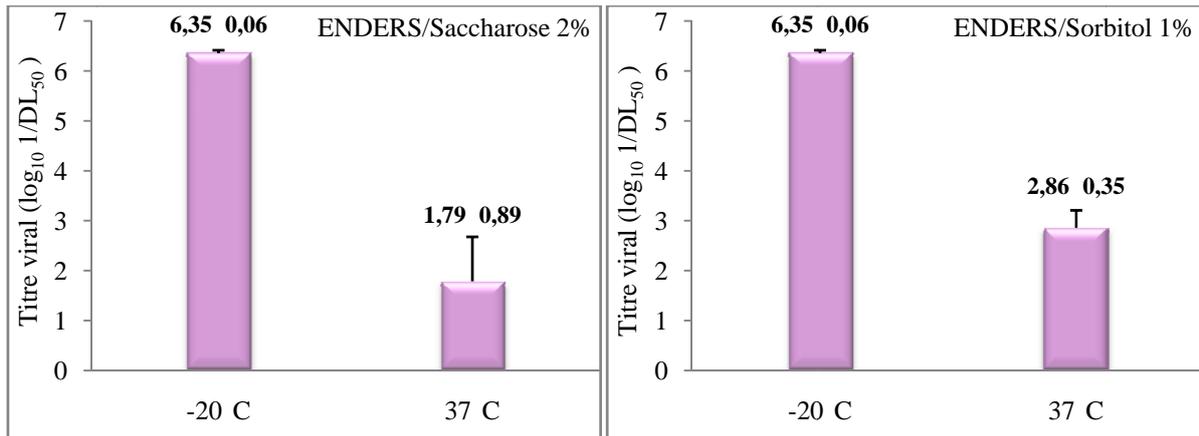
**Tableau 8 : Les titres viraux rabiques (en  $\log_{10}1/DL_{50}$ ) après incubation dans le saccharose à 2% et le sorbitol à 1%**

Test N°	Titre viral initial	Titre viral : ENDERS/saccharose 2%	Titre viral initial	Titre viral : ENDERS/sorbitol 1%	p
1	6,33	1,50	6,33	3,25	-
2	6,33	0,50	6,33	2,25	-
3	6,33	1,00	6,33	3,00	-
4	6,33	1,75	6,33	2,75	-
5	6,33	2,25	6,33	3,00	-
6	6,33	3,50	6,33	3,25	-
7	6,50	2,00	6,50	2,50	-
<b>Moyenne (écart-type)</b>	<b>6,35±0,06<sup>a</sup></b>	<b>1,79±0,89<sup>b</sup></b>	<b>6,35±0,06<sup>a</sup></b>	<b>2,86±0,35<sup>b</sup></b>	<b>&lt;0,01</b>
<b>CV(%)</b>	<b>0,94</b>	<b>49,88</b>	<b>0,94</b>	<b>12,25</b>	

Les résultats obtenus montrent que le titre viral initial sans ajout de stabilisants est significativement supérieur ( $p<0,01$ ) au titre du virus rabique après 7jours d'incubation à

37°C dans la solution ENDERS/saccharose à 2% et dans la solution ENDERS/sorbitol à 1% (Tableau 8).

Malgré l'ajout de sorbitol ou de saccharose le titre viral a diminué de façon importante pour la solution de sorbitol (de  $6,35 \pm 0,06$  jusqu'à  $2,86 \pm 0,35$ ) et de façon drastique de  $6,35 \pm 0,06$  (titre initial) pour atteindre la valeur de  $1,79 \pm 0,89$  pour la solution de saccharose après l'incubation (Fig 17).



**Fig 17 : Evolution du titre du virus rabique (Moyenne±écart-type) après incubation dans le saccharose (2%) et le sorbitol (1%)**

L'incubation du virus rabique à 37°C pendant 7 jours dans la solution ENDERS/sorbitol à 1% est accompagnée d'une perte très importante (55,04%) du titre du virus rabique atteignant 71,90% pour la solution ENDERS/saccharose à 2%.

Dans ce cas, la quantité de particules virales qui a pu se maintenir à 37°C après 7j d'incubation dans la solution ENDERS/saccharose à 2% est très faible (28,10%) et peut être négligeable, alors qu'elle est relativement importante et non négligeable (44,96%) pour la solution ENDERS/sorbitol à 1%.

### 2.2.3. Etude de la stabilité du virus ERA/Vero dans la solution PBS/Sorbitol et eau distillée/Sorbitol

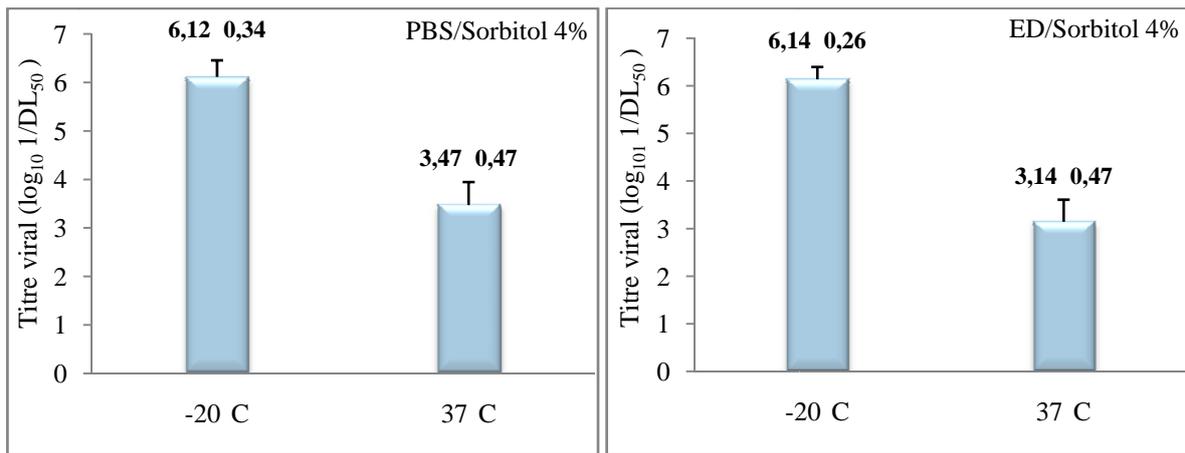
Dans cet essai la stabilité du virus rabique contenu dans le surnageant est étudiée en présence du sorbitol à 4%, véhiculé par le tampon PBS et par l'eau distillée (**Tableau 9**)

**Tableau 9 : Les titres viraux rabiques (en  $\log_{10}1/DL_{50}$ ) après incubation dans le sorbitol à 4%**

Test N°	Titre viral initial	Titre viral : PBS/sorbitol 4%	Titre viral initial	Titre viral : ED/sorbitol 4%	p
1	6,33	4,33	6,33	3,50	-
2	6,33	3,33	6,33	3,00	-
3	6,33	3,83	6,33	3,67	-
4	6,33	2,67	6,33	2,17	-
5	6,33	3,33	5,83	3,17	-
6	5,50	3,33	6,17	3,00	-
7	5,67	3,50	5,67	3,50	-
<b>Moyenne (écart-type)</b>	<b>6,12±0,34<sup>a</sup></b>	<b>3,47±0,47<sup>b</sup></b>	<b>6,14±0,26<sup>a</sup></b>	<b>3,14±0,47<sup>b</sup></b>	<b>&lt;0,01</b>
<b>CV(%)</b>	<b>5,55</b>	<b>13,63</b>	<b>4,18</b>	<b>14,82</b>	

D'après le tableau 9, la même observation peut être faite pour les présentes solutions stabilisantes utilisées. Le titre viral initial sans ajout de stabilisants est significativement supérieur ( $p < 0,01$ ) au titre du virus rabique après 7 jours d'incubation à 37°C en présence des solutions de PBS/sorbitol à 4% et eau distillée/sorbitol à 4%.

L'incubation du virus rabique pendant 7 j à 37°C dans ces milieux est également accompagnée d'une diminution du titre viral. Ce titre après l'incubation, diminue de 6,12±0,34 pour l'initial et atteint la valeur de 3,47±0,47 pour le PBS/sorbitol et de 6,14±0,26 jusqu'à 3,14±0,47 pour la solution ED/sorbitol (**Fig 18**). Pour ces deux solutions stabilisantes les valeurs du titre viral se rapprochent.



**Fig 18: Evolution du titre du virus rabique (Moyenne±écart-type) après incubation dans le sorbitol (4%)**

L'incubation du virus rabique à 37°C dans la solution PBS/sorbitol à 4% pendant 7 jours s'est accompagnée d'une perte de 43,20% du titre du virus rabique, la perte virale est de 48,80% pour la solution eau distillée/sorbitol à 4%.

Malgré cette perte, il reste un pourcentage important et non négligeable de particules virales qui se maintiennent en présence de 4% de PBS/sorbitol (56,80%) ou de 4% d'eau distillée/sorbitol (51,20%) après 7j d'incubation à 37°C. Mais ce pourcentage reste plus élevé avec la solution de PBS/sorbitol à 4%.

Une comparaison est réalisée entre les titres du virus rabique obtenus après 7j d'incubation à 37°C en présence des milieux stabilisants précédents avec ceux du virus rabique mis pendant 7j à 37°C sans ajout de produits stabilisants, obtenus dans le premier essai (**Tableau 10**).

**Tableau 10 : Comparaison des titres du virus rabique (Moyenne  $\pm$ écart-type) entre les différents milieux stabilisants après 7j d'incubation à 37°C**

(Les moyennes affectées de lettres différentes sont significatives au seuil de 5%)

Titre viral	Virus rabique en présence de stabilisants						p
	1	2	3	4	5	6	
<b>Virus rabique sans stabilisants</b>							
S <sup>-</sup>	PBS/sorbitol (4%)	ED/sorbitol (4%)	ENDERS	ENDERS/sorbitol (1%)	PBS	ENDERS/saccharose (2%)	
<b>6,07<math>\pm</math>0,26</b>	<b>6,12<math>\pm</math>0,34</b>	<b>6,14<math>\pm</math>0,26</b>	<b>6,35<math>\pm</math>0,06</b>	<b>6,35<math>\pm</math>0,06</b>	<b>5,78<math>\pm</math>0,50</b>	<b>6,35<math>\pm</math>0,06</b>	
<b>2,43<math>\pm</math>0,11<sup>a</sup></b>	<b>3,47<math>\pm</math>0,47<sup>b</sup></b>	<b>3,14<math>\pm</math>0,47<sup>bc</sup></b>	<b>3<math>\pm</math>0,35<sup>c</sup></b>	<b>2,86<math>\pm</math>0,35<sup>c</sup></b>	<b>2,62<math>\pm</math>0,51<sup>ac</sup></b>	<b>1,79<math>\pm</math>0,89<sup>d</sup></b>	<b>&lt; 0,05</b>

Le titre du virus rabique mis pendant 7j à 37°C dans la solution PBS/sorbitol à 4% (3,47 $\pm$ 0,47) est significativement supérieur ( $p < 0,01$ ) au titre du virus rabique mis sans stabilisant pendant 7j à 37°C (2,43 $\pm$ 0,11).

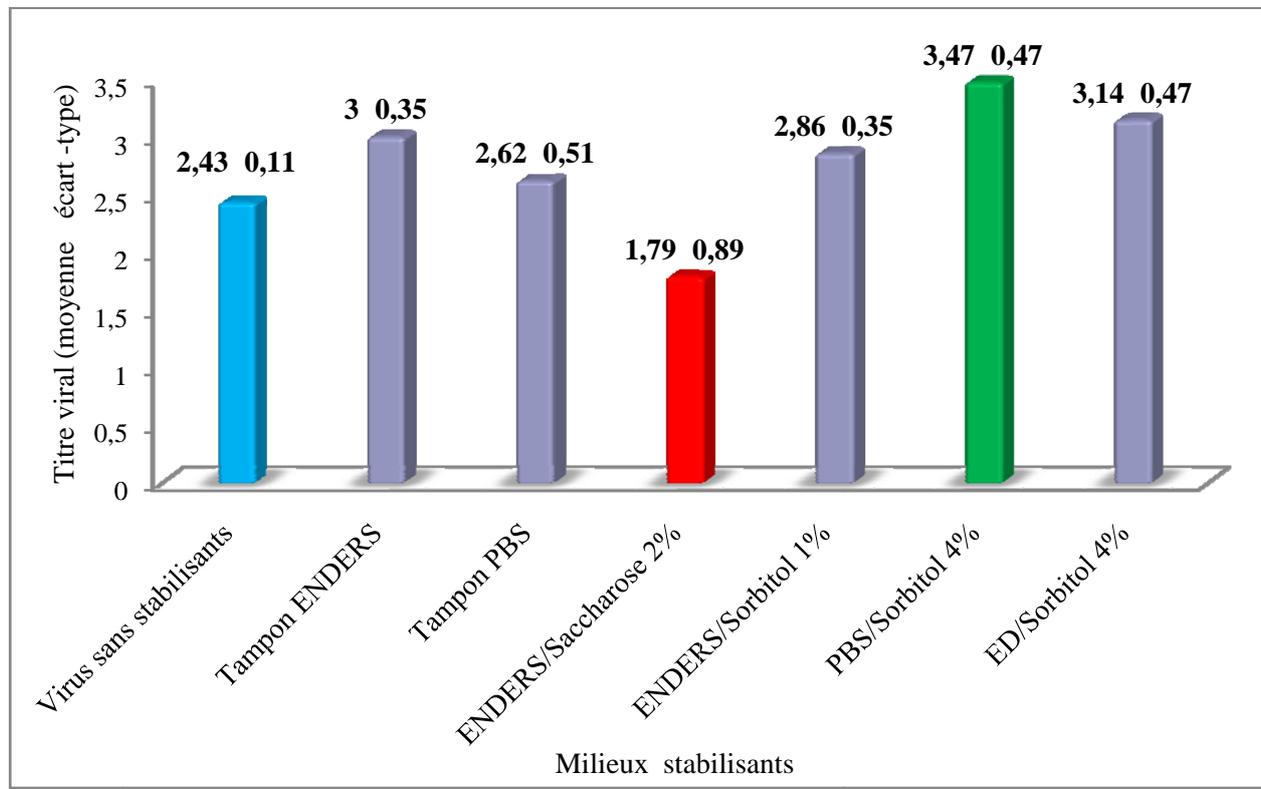
Les titres du virus rabique mis pendant 7j à 37°C dans la solution eau distillée/sorbitol à 4% (3,14 $\pm$ 0,47), ou dans le tampon ENDERS (3 $\pm$ 0,35), ou avec la solution ENDERS/sorbitol à 1% (2,86 $\pm$ 0,35), sont significativement supérieur ( $p < 0,05$ ) au titre du virus rabique mis sans stabilisants pendant 7j à 37°C (2,43 $\pm$ 0,11).

Il apparaît que tous ces milieux (1, 2, 3, 4) ont entraîné un effet stabilisant sur le virus ERA/Vero.

Le titre du virus rabique mis pendant 7j à 37°C avec le tampon PBS (2,62 $\pm$ 0,51) est supérieur au titre du virus rabique mis sans stabilisants pendant 7j à 37°C (2,43 $\pm$ 0,11), mais cette différence reste non significative ( $p > 0,05$ ). Le tampon PBS seul n'a pas entraîné un effet stabilisant sur le virus ERA/Vero.

Par ailleurs, le titre du virus rabique mis pendant 7j à 37°C sans stabilisants (2,43 $\pm$ 0,11) est significativement supérieur ( $p < 0,05$ ) au titre du virus rabique mis dans la solution ENDERS/saccharose à 2% pendant 7j à 37°C (1,79 $\pm$ 0,89). La solution ENDERS/saccharose à

2% n'a pas donné un effet stabilisant sur le virus de la rage, par contre un effet inverse c'est à dire néfaste pour le virus rabique ERA/Vero a été obtenu.



**Fig 19 : Comparaison des titres du virus rabique (Moyenne ±écart-type) obtenus entre les différents milieux stabilisants après 7j d'incubation à 37°C**

(Les moyennes affectées de lettres différentes sont significatives au seuil de 5%)

L'étude comparative des milieux utilisés comme stabilisants dans notre essai représentée par la figure 19 montre que :

Le titre le plus élevé en particules virales après 7 j d'incubation à 37°C, correspond à celui où le virus a été mis dans la solution de PBS/sorbitol à 4% ( $p < 0,01$ ) (comparativement au virus témoin S<sup>-</sup>) (**Tableau 10**), suivi par la solution eau distillée/sorbitol à 4% avec une différence non significative ( $p > 0,05$ ) par rapport à la solution de PBS/sorbitol à 4%.

Juste après, vient le tampon ENDERS, la solution ENDERS/sorbitol à 1% et le tampon PBS mais toutefois la différence reste non significative ( $p > 0,05$ ) avec la solution Eau distillée/sorbitol à 4%. La solution ENDERS/saccharose à 2% semble la moins recommandée pour maintenir un bon titre viral.

## **Discussions**

### 3. DISCUSSIONS

Très peu d'études ont été publiées concernant la détermination de la stabilité du virus rabique en milieux stabilisants, particulièrement celles qui concernent le couple ERA/Vero. Celle que nous avons pu obtenir, a portée sur l'observation de l'inactivation thermique de différentes souches de virus rabique et d'autres Rhabdoviridae en présence d'agents chélateurs et d'autres produits stabilisants. Elle est la première étude, réalisée par **Michalski et collaborateurs (1976)**.

Le manque d'informations concernant la composition et la préparation des produits stabilisants, a également causé des difficultés pour la réalisation de cet essai et notamment pour les discussions des résultats. Il faut rappeler qu'ils sont l'œuvre de travaux de producteurs et que les résultats ne sont pas publiés.

Les résultats obtenus sont comparés avec ceux des études de stabilité d'autres agents microbiens principalement viraux, appartenant essentiellement au groupe des virus à ARN simple brin de polarité négative et enveloppés.

Les titres enregistrés des surnageants de virus rabique conservés à basses températures (-20°C/-70°C) ( $6,07 \pm 0,26$ ), sont significativement supérieur ( $p < 0,01$ ) à ceux conservés pendant 7 jours à +4°C ( $5,18 \pm 0,32$ ), 25°C ( $4,11 \pm 0,29$ ) et à 37°C ( $2,43 \pm 0,11$ ), le virus rabique se maintient stable et se conserve bien lorsqu'il est stocké dans le froid (-20°C à -70°C). Ces résultats corroborent avec ceux de **Lepine et Gamet (1969)** qui ont constaté que la congélation à -20°C assure une très bonne conservation de la virulence du virus rabique, et avec ceux de **Chen et al. (2008)** qui indiquent qu'afin de garder un titre infectieux acceptable pour l'immunisation, les stocks de virus doivent être conservés à températures ultra basses ( $\leq -60^\circ\text{C}$ ), surtout lorsqu'ils sont sous forme liquide où ils doivent être conservés à -70°C.

D'autre part nous avons constaté que le virus rabique sans stabilisants se maintient stable à +4°C jusqu'à 7j d'incubation. Ces résultats correspondent à ceux de **Toma et Koutchoukali (1985)** qui ont apporté que le virus rabique peut résister pendant plusieurs jours à +4°C. Nous avons également constaté que les titres du virus rabique conservé à -20°C ou à -70°C, peuvent être supérieurs ( $p < 0,01$ ) ou égaux à ceux du virus stocké à +4°C, ceci peut être expliqué par le fait que le virus rabique peut résister aux congélations et décongélations répétées tel qu'il a été observé par **Kaplan et Koprowski (1974)** et **Meslin et al. (1999)**.

Les résultats obtenus montrent que le virus rabique n'est pas stable à 25°C et à 37°C. En effet, l'incubation du virus rabique à 37°C pendant 7j s'est accompagnée d'une perte drastique du titre viral (60%), nous pouvons expliquer cela soit par la fragilité et la susceptibilité accru du virus rabique à la chaleur, observée par plusieurs auteurs (**Dureux, 1973, Fleury, 2002, Bevilacqua et al., 2004, Rupprecht et Gibbons, 2004, Sastre et al., 2007**). Ou encore par les modifications du pH du milieu de culture dans le quel nous avons cultivé le virus. Le virus rabique étant très sensible aux variations de pH notamment les pH acides (**Koldajew et Pikul, 1934, Kuwert et Liepenow, 1959, Lepine et Gamet, 1969**), le virus ayant séjourné 7j à l'étuve de 37°C dans un milieu riche en sucres et en protéines (DMEM), ceci peut engendrer une acidification du milieu qui pourra avoir une action virulicide sur le virus rabique.

Par ailleurs, certains auteurs suggèrent que le virus rabique a les mêmes caractères de sensibilité du myxovirus (**Pinteric, Fenje et Almeida, 1963**), cependant, malgré cela et malgré la perte en titre viral obtenus à 37°C, nous avons constaté que le virus rabique résiste quand même à 37°C jusqu'à 7j d'incubation à un titre mesurable par la technique d'inoculation cérébrale ( $2,43\log_{10}$ ) et assez élevé lorsqu'il est comparé avec le vaccin vivant qui doit conserver un titre minimal de  $3\log_{10}$  après exposition du vaccin à 37°C pendant 7jours (**Kaplan et Koprowski, 1974, Ohtake et al., 2010**). Cela, rejoint donc la constatation d'**Andrewes et Horstmann (1949)** qui ont classifié le virus rabique comme étant un « virus résistant ».

Par contre, dans l'étude faite par **Turner et Kaplan en 1967** sur les propriétés du virus rabique de la souche fixe Pasteur produite sur cerveaux de souris adultes et partiellement purifiée et contrairement à ce que nous avons obtenus, le virus rabique s'est révélé stable à 37°C jusqu'à 2 heures de temps uniquement et a perdu plus de 99,9% de son titre après 24 heures de temps à cette température. Plusieurs explications peuvent être fournies concernant la résistance du virus rabique aux températures élevées obtenue dans nos conditions de travail. La première est la pureté des antigènes qui a été également évoqué par **Pfleiderer en 2009**. La deuxième est apporté par **Ikizler et Wright en 2002** qui ont indiqué que la thermostabilité d'un vaccin donné, dépend non seulement des propriétés individuelles du virus mais également du système de culture sur le quel il pousse. En effet, en faisant cultiver le virus rabique sur culture cellulaire, le virus produit ainsi, est plus adapté aux températures élevées utilisées dans ce système de culture. Les cultures de cellules infectées sont incubées à 37°C et

à 33°C avant récolte. On peut penser que lors de la culture in vitro il y a déjà une sélection de particules virales génétiquement plus résistantes (Mutants thermostables), puisque ces particules libérées dans le surnageant sont soumises à l'agressivité du milieu (pH, Température,...ect) alors que les particules produites sur cerveau de souris restent dans un environnement homéostatique qui ne permet pas cette sélection.

Une autre explication peut être fournie, qui est le choix du système de production ; c'est-à-dire la souche ERA produite sur cellule Vero (ERA/Vero), cette combinaison pourrait également être à l'origine de cette résistance aux températures élevées de 25°C et de 37°C.

Nos résultats ont révélé que, malgré l'addition de milieux dits stabilisants au virus rabique ERA/Vero et quelque soit le milieu stabilisant, l'incubation du virus rabique à 37°C pendant 7j dans ces différents milieux est accompagnée d'une diminution importante (**Fig 16,17,18**) et significative ( $p < 0,01$ ) du titre viral en comparant ces titres avec ceux du surnageant conservé à -20°C ou -70°C (initial) (**Tableaux 7, 8, 9**). Cela pourrait être expliqué, soit par les concentrations utilisées qui ne sont pas efficaces pour engendrer l'effet stabilisant souhaité, soit par les variations osmotiques qui peuvent survenir dans l'environnement du virus rabique après incorporation de ces milieux (ions, sucres), ou bien par les propriétés physicochimiques des produits stabilisants utilisés (décomposition dans les fortes températures). Ou encore et comme il a été expliqué, que le virus rabique reste sensible aux fortes températures de 37°C, suggérant l'importance d'incorporer des agents protecteurs tel que par exemple le sérum (**Mobest, 1959**), l'albumine (**Toma et Koutchoukali, 1985**), ou la glycérine (**Mammette, 2002**), à la suspension virale.

Cependant, la comparaison des titres du virus rabique obtenus dans le deuxième essai en présence des milieux stabilisants utilisés, avec ceux du virus rabique sans ajout de produits stabilisants obtenus lors du premier essai (**Tableau 10**), a révélé que l'addition de certains de ces stabilisants a permis d'améliorer la stabilité thermique du virus rabique, puisqu'il existe un pourcentage non négligeable et significatif ( $p < 0,05$ ) de particules virales qui se maintiennent après incorporation de ces produits stabilisants.

Les sels, tels que le  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , le  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , le  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ou le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , ont été utilisés comme agents stabilisants dans certains vaccins à virus vivants (**Burke et Volkin, 2001**). Le tampon ENDERS seul se révèle bon stabilisant pour le virus rabique ERA/Vero et cela peut être due à sa composition qui comporte le  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , ou le  $\text{NaCl}$  qui est utilisé également

comme stabilisant (**Rapp et al., 1965**), l'ajout de sorbitol (1%) ou de saccharose (2%) au tampon ENDERS n'apporte rien. Ceci pourrait être expliqué par cette association ENDERS/sorbitol ou ENDERS/saccharose qui n'est pas adéquate. En effet il se peut qu'il y ait des interactions entre le sorbitol ou le saccharose avec un ou plusieurs constituants du tampon ENDERS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, NaOH), ce qui pourrait engendrer un effet inverse sur le virus rabique.

L'utilisation du tampon PBS dans notre essai a montré que seul il n'a pas entraîné un effet stabilisant pour le virus de la rage, contrairement aux résultats de **Michalski et al. (1976)** qui ont obtenus un effet protecteur du tampon PBS sur le virus rabique ERA cultivé sur cellules BHK-21 contre l'inactivation thermique à 37°C, cela peut être expliqué par le type de cellules utilisées et/ou par d'autres paramètres (pH,...ect). Par ailleurs, **Stinchcombe et al. (2008)** ont montré que l'incubation du flavivirus pendant 24 heures à 37°C dans le tampon PBS en l'absence d'agents stabilisants, est accompagnée d'une perte complète (100%) du titre viral. Le résultat a également montré que le PBS n'a pas d'effet stabilisant sur le virus rabique mais avec un pourcentage de perte virale de 54,73 et non pas de 100%.

Le tampon PBS est un mélange d'ions et de sels reconnus pour leurs rôle stabilisants pour différents agents microbiens en particulier le  $\text{Ca}^{+2}$  et le  $\text{Mg}^{+2}$  (**Koyama et Osame, 1999**). En effet plusieurs auteurs ont constaté l'effet protecteur de ces ions contre l'inactivation thermique de certains virus ; des combinaisons contenant du calcium et du zinc améliorent la stabilité du vaccin de la rougeole après deux semaines de stockage à 37°C (**Ohtake et al., 2010**), et inhibent l'inactivation du rotavirus à 37°C (**Truong-Le et al., 2010**). Cependant **Ferreira et al. (2009)** ont constaté que le  $\text{MgCl}_2$  entraîne une thermostabilisation du virus polio, alors qu'un autre composant contenant le Mg (le  $\text{MgSO}_4$ ) a un effet stabilisant sur les Myxovirus mais pas sur le virus de la stomatite vésiculeuse (**Wallis et al., 1965**).

Cette différence sur l'effet stabilisant du PBS serait probablement liée soit à la proportion utilisée, à la concentration des ions contenus dans le tampon, ou bien à l'agent viral.

L'utilisation du saccharose à la concentration de 2% dans le tampon ENDERS n'a induit aucun effet stabilisant pour le virus rabique ERA/Vero, surtout en comparaison avec les autres produits testés. Dans la littérature, l'effet stabilisant du saccharose est controversé.

Les travaux de **Sood et al. en 1993** apportent que le saccharose a un effet stabilisant du vaccin de la fièvre jaune, alors qu'il a un faible effet stabilisant du virus influenza (**Ikizler et**

**Wright, 2002**). Par ailleurs, à la concentration de 2% est un mauvais stabilisant pour le vaccin antisalmonellique (perte de 100% du titre) (**Barbour et al., 2002**) ce qui rejoint notre résultat (perte de 71,90% du titre viral).

En outre, **Asim et al.(2008)** ont montré que le titre du virus de la peste des petits ruminants se maintient constant pendant plusieurs mois dans un vaccin lyophilisé préparé avec 5% de saccharose mélangé avec l'hydrolysate de lactalbumine et le sodium glutamate et stocké à -20°C, alors que les travaux de **Sarkar et al. en 2003** ont démontré que le saccharose à 10% préparé dans la solution de HBSS donne une meilleure stabilité de ce vaccin stocké à 37°C. Notre résultat peut être expliqué soit par la faible concentration utilisée (2%) pour induire un effet stabilisant, soit par la température utilisée dans le test de stabilité, ou par le fait que le saccharose est utilisé beaucoup plus comme excipient de lyophilisation et non pas comme stabilisant (utilisé comme stabilisant à +4°C).

Nos résultats ont montré que le PBS seul n'a pas donné un effet stabilisant sur le virus rabique ERA/Vero, mais l'effet stabilisant du PBS a été meilleur avec l'ajout de sorbitol à 4%. Les polyols sont utilisés comme stabilisants dans les vaccins (**Oberreither et al., 2010**), mais à des concentrations différentes. Dans certaines préparations de stabilisants vaccinaux, le sorbitol est utilisé à des concentrations de 1% (**Toriniwa et Komiya, 2008**), 1,8% jusqu'à 2% (**Makino et al., 1991**). Dans d'autres cas, il sera avantageusement présent dans une proportion allant de 3 à 5 %, de manière particulièrement avantageuse le sorbitol pourra être présent en proportion de 5 % (**Fanget et Francon, 2001**).

La solution de PBS/sorbitol à 4% (3,47±0,47) ou la solution eau distillée/sorbitol à 4% (3,14±0,47) toutes deux ont donné un bon effet stabilisant de façon non significative l'une par rapport à l'autre (p<0,05) ce qui peut prouver que c'est le sorbitol qui a joué le rôle stabilisant.

Cependant, **Stinchcombe et al. en 2008** apportent qu'une utilisation de sorbitol aux concentrations de 5%, 10 % et 15% préparé dans le tampon PBS, n'a pas donné d'effet stabilisant sur le flavivirus après incubation à 37°C pendant 24heures (perte de 100% du titre viral), cela n'est pas en concordance avec notre résultat, puisque l'utilisation du sorbitol à 4% véhiculé par le tampon PBS a entraîné l'effet stabilisant le plus élevé sur le virus rabique parmi les autres produits stabilisants (p<0,01) (perte de 43,20% du titre viral).

Nos résultats corroborent avec ceux de **Monath (1996)**, qui ont montré que le sorbitol à 2% préparé dans le tampon PBS a entraîné un très bon effet stabilisant du vaccin de la fièvre jaune à 37°C après 14j de stockage. Et avec ceux de **Barbour et al. (2002)** qui ont également trouvé que l'utilisation du sorbitol à 4% préparé dans l'eau distillée pour développer un vaccin antisalmonellique provoque un effet stabilisant avec une plus faible perte du titre infectieux à la concentration de 4% à 55°C après 48h.

Le plus souvent, dans les études de stabilités en milieux stabilisants, les produits sont utilisés en association sous forme de mélanges (sucres, acides aminés, ions, polyol, protéines,...ect) et dans quelques cas ils sont utilisés séparément.

Les disaccharides tel que le tréhalose, le saccharose, le maltose, et le lactose, semblent être les stabilisants les plus efficaces et universels parmi les sucres et les polyols (**Arakawa et al., 1993, Carpenter et al., 1997**). Cependant, le sorbitol s'est révélé meilleur stabilisant thermique que le saccharose pour le vaccin antisalmonellique (**Barbour et al., 2002**), ce qui corroborent avec notre résultat qui montre que le sorbitol est significativement ( $p < 0,05$ ) meilleur stabilisant que le saccharose pour le virus rabique .

Toute fois, la concentration du produit stabilisant influence grandement l'effet recherché. Le saccharose à 2% est mauvais stabilisant pour le virus rabique, certes, son utilisation à des concentrations élevées ( $>2\%$ ) serait à l'origine d'une augmentation de la stabilité thermique du virus des oreillons (**Volkin et al., 2001**). D'autre part le sorbitol préparé dans le PBS a induit le meilleur effet stabilisant ( $p < 0,01$ ) pour le virus rabique en comparaison avec les autres stabilisants utilisés. L'association des ions  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Mg}^{+2}$  jouerait un rôle dans la détermination de la stabilité thermique de certains virus (**Koyama et Osame, 1999**). Leur incorporation dans notre mélange de stabilisant (sorbitol/PBS) pourrait donc être à l'origine d'un effet stabilisant potentialisateur.

En plus de la concentration, le mélange ou non de stabilisants peut également faire modifier le résultat. Dans le cas du vaccin de la rougeole, l'utilisation combinée d'un polyol et d'un disaccharide (le sorbitol et le saccharose) engendrerait une amélioration remarquable de la stabilité de ce vaccin (**Volkin et al., 2001**), de plus il a été apporté que le mélange de saccharose, de lactalbumine, de  $\text{CaCl}_2$  et de  $\text{MgSO}_4$ , a maintenu le vaccin de la fièvre jaune de façon significativement plus stable à 37°C que le tréhalose seul (**Adebayo et al., 1998**).

L'évaluation du saccharose comme stabilisant utilisé seul, pourrait expliquer son effet négatif sur le virus rabique. Le mélange avec le sorbitol ou l'incorporation d'un autre produit (ions  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Mg}^{+2}$ , protéines ou sucres) pourrait induire un effet potentialisateur sur le saccharose.

Il existe une différence dans le moment de l'ajout du stabilisant à la préparation antigénique. **Fanget et Francon (2001)** rapportent que la mise en contact des virus avec l'agent stabilisant peut être effectuée avant, pendant ou après la récolte du virus destiné à la production du vaccin et indiquent que la mise en contact, sera avantageusement effectuée avant la récolte (**Brahimi, résultat non publié**). Dans la présente étude, l'incorporation du milieu stabilisant avec le virus rabique s'est effectuée après la récolte des surnageants de virus rabique. Ainsi, le mélange du stabilisant avec la souche vaccinale peut se faire à différents moments de la production du vaccin, ce qui peut influencer le résultat. Tel qu'il a été démontré par l'étude de **Toriniwa et Komiya en 2008**, qui a par contre révélé que l'addition de stabilisants durant la période d'inactivation et après purification produirait une stabilité prolongée du vaccin de l'encéphalite japonaise, en particulier, l'addition de stabilisant pendant le processus d'inactivation est probablement nécessaire pour la stabilité des sites antigéniques.

Dans le but d'évaluer la stabilité du virus rabique en milieux stabilisants, un dénombrement des particules virales présent dans les différents milieux a été effectué. Ce titrage a été réalisé par inoculation intracérébrale du virus rabique à des souriceaux nouveaux nés âgés de 3 à 4j (**OIE, 2005**). Afin de rechercher le nombre de particules virales par unité de volume, le calcul de la  $DL_{50}$  (la dose létale capable de tuer 50% des animaux inoculés) par la méthode de Spearman-Kärber a été réalisé (**Meslin et al., 1999**).

Cette technique de part sa précision élevée puisqu'elle se fait in vivo, a fourni plusieurs avantages par rapport aux techniques citées ultérieurement. Le coût faible de cette technique, ainsi que la faisabilité et la répétabilité des essais. En effet, l'existence d'un grand élevage de souris à l'IPK a permis d'utiliser un nombre important de souriceaux et de pouvoir ainsi effectuer et relancer les titrages l'un après l'autre. Seul inconvénient majeur de cette technique, est le nombre important de portée (Ce projet étant retenu dans le cadre de la recherche et du développement de l'IPK, l'utilisation d'un nombre important d'animaux a été accepté), avec un minimum de 4 souriceaux (une portée) par dilution et un nombre de dilutions de 4 par test réalisé, répartis comme suit :

Dans l'étude de la stabilité à +4°C, 25°C et à 37°C, 4 dilutions par température sont faites, donc 4 portées (16 souriceaux) par température sont utilisées, ce qui fait 12 portées (48 souriceaux) pour l'ensemble des 3 températures et cela c'est pour un seul test. La répétabilité du test est de 7 fois ce qui fait un total de 84 portées, l'équivalent de 336 souriceaux rien que pour le premier essai.

Dans l'étude de la stabilité du virus rabique en milieux stabilisants, 6 milieux ont été testés (Le tampon ENDERS, le tampon PBS, la solution ENDERS/saccharose, la solution ENDERS/sorbitol, la solution PBS/sorbitol, la solution Eau distillée/sorbitol), en effectuant 4 dilutions par milieu et donc l'équivalent de 4 portées (16 souriceaux) par milieu, ce qui fait 28 portées (112 souriceaux) pour les 7 tests, pour un seul milieu stabilisant. Une répétabilité de 7 fois pour chacun des milieux testés, d'où un nombre de 168 portées, l'équivalent de 672 souriceaux pour les 6 milieux.

Ce qui fait un total de 252 portées et donc de 1008 souriceaux inoculés au cours de ce travail.

D'autres techniques de titrages sont communément employées pour déterminer le nombre de particules virales ou le titre en antigènes (activité) contenus dans une solution. Deux types de techniques (in vivo et in vitro) sont couramment utilisés et cités dans la littérature :

- In vivo

- Un contrôle d'activité basée sur l'épreuve du NIH est employé pour tester la stabilité du vaccin antirabique (**WHO, 2009**), cette épreuve est réalisée pour déterminer la valeur antigénique (en U.I) du vaccin inactivé (**Krämer et al., 2009**). Contrairement à notre étude de stabilité qui a été réalisé sur le surnageant de virus rabique vivant avant sa transformation en vaccin.

- In vitro

- Le titrage sur culture cellulaire réalisé dans des chambres Lab-tek : le virus rabique peut se multiplier dans les cellules de lignée continue et induire la formation d'inclusions virales, ces inclusions peuvent être révélées après fixation du conjugué fluorescent anti-nucléocapside (**McElhinney et al., 2008**). La lecture se fait au microscope à fluorescence et le dénombrement des foyers de fluorescence se fait par cupule en balayant tout les champs pour chaque cupule. Le calcul du titre se fait par la méthode de Reed et Muench. Au départ de notre travail, nous avons opté pour cette technique de titrage, mais

présentant l'inconvénient d'être coûteuse (chambres Lab-tek) et astreignante, elle a été délaissée et totalement remplacée par la méthode in vivo.

➤ Le titrage sur culture cellulaire réalisé dans des plaques de microtitration, c'est une technique très utilisée pour évaluer le titre viral dans les études de stabilité (**Yannarell et al., 2002, Sarkar et al., 2003, Ferreira et al., 2009**). Cependant, le principe de cette technique est basé sur l'observation de la formation des ECP afin de pouvoir réaliser le calcul du titre, or, le virus de la rage n'entraîne pas la formation d'ECP, cette technique a très peu d'intérêt pour le calcul du titre viral dans le cas de la rage.

➤ Le titrage par l'épreuve des plages en couches monocellulaires (**Kaplan et Koprowski, 1974**). C'est une technique précise mais présente l'inconvénient de ne pas pouvoir disposer de cellules capables de révéler l'ECP du virus rabique (exemple : les cellules CER, Cheek Embryo Related).

➤ D'autres méthodes in vitro sont utilisées pour déterminer non pas le titre viral, mais pour évaluer la réponse en anticorps suite à l'administration d'antigènes, exemple la technique ELISA (**Chen et al., 2010**).

## CONCLUSION

L'analyse des résultats de notre étude sur la stabilité du virus de la rage ERA/Vero, obtenus par la technique de titrage *in vivo* (inoculation du virus rabique à des souriceaux nouveaux nés âgés de 3 à 4j) a révélée que :

Le virus rabique ERA/Vero se conserve bien à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou à  $-70^{\circ}\text{C}$ , assez bien à  $+4^{\circ}\text{C}$ , mais qu'il est sensible aux températures supérieures de  $25^{\circ}\text{C}$  et de  $37^{\circ}\text{C}$ . Plus la température est élevée plus la perte en titre du virus rabique est élevée.

L'addition d'un stabilisant connue pour son rôle stabilisateur du virus rabique a permis de ralentir l'effet négatif de la température sur la détérioration des particules virales qui se traduit par une baisse du titre. Dans nos conditions de travail, les résultats ont permis de voir qu'à part le PBS et le saccharose à 2% véhiculé par le tampon ENDERS, tout les autres milieux utilisés au cours de cet essai : tampon ENDERS, le sorbitol à 1% véhiculé par le tampon ENDERS, le sorbitol à 4% véhiculé par le tampon PBS, le sorbitol à 4% véhiculé par l'eau distillée, ont donné un effet stabilisant sur le virus de la rage ERA/Vero après 7j d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$ .

L'étude comparative de ces milieux stabilisants permet de les classer du meilleur au moins efficace :

1. Le sorbitol à 4% véhiculé par le tampon PBS
2. Le sorbitol à 4% véhiculé par l'eau distillée, le tampon ENDERS et le sorbitol à 1% véhiculé par le tampon ENDERS
3. Le tampon PBS
4. Le saccharose à 2% véhiculé par le tampon ENDERS

Malgré sa fragilité et sa sensibilité aux températures élevées, le virus de la rage ERA/Vero mis à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 7j est retrouvé après l'analyse à un titre jugé acceptable.

La formulation qui a donné le meilleur effet stabilisant sur le virus de la rage étant celle du sorbitol à 4% véhiculé par le tampon PBS.

Seul le saccharose s'est révélé inefficace, son utilisation à la concentration de 2% véhiculé par le tampon ENDERS n'a pas donnée un effet stabilisant sur le virus rabique, mais un effet inverse c'est-à-dire néfaste ou délétère sur le virus de la rage.

Au vue des résultats obtenus nous pouvons dire que :

Dans les conditions de la pratique, les campagnes de vaccinations peuvent se faire de façon moins contraignante liée à la chaîne du froid, puisque la souche de virus rabique ERA/Vero peut résister et se maintenir à 37°C.

La solution de sorbitol à 4% véhiculé par le tampon PBS peut constituer une formulation idéale, adéquate et économique pour être incorporée dans les préparations vaccinales, afin d'aboutir à la production d'un vaccin antirabique thermostable et plus commode notamment dans les conditions drastiques de la pratique.

Par ailleurs, le virus rabique s'est révélé stable en présence du tampon ENDERS seul sans incorporation de sorbitol ou de saccharose, ce qui pourrait constituer à lui seul un bon stabilisant pour le vaccin antirabique.

## PERSPECTIVES

Un vaccin antirabique thermostable, promet de simplifier la logistique de distribution des vaccins et d'améliorer la couverture vaccinale contre cette maladie. En perspectives, il serait intéressant d'orienter ce travail vers d'autres axes de recherche par :

1. Le choix du titre viral de départ : travailler sur des surnageants ayant un titre initial de  $10^8$ DL<sub>50</sub> ou plus, afin de bien pouvoir distinguer la perte du titre viral entre les différents produits stabilisants testés.
2. La durée d'incubation : effectuer une cinétique d'inactivation thermique (test de stabilité) du virus rabique étalée dans le temps, c'est-à-dire prolonger le temps d'incubation (jusqu'à 15 jours ou plus), ou bien raccourcir ce temps d'incubation (3 à 4j).
3. Il serait judicieux de tester le sorbitol à d'autres concentrations en tampon PBS, ou bien effectuer le mélange du sorbitol à un autre stabilisant (exemple : le tréhalose) à des concentrations différentes. Ou encore l'essai d'autres produits stabilisants tel que la gélatine, les acides aminés, et d'autres protéines, tout en essayant de faire des combinaisons de ces derniers avec plusieurs concentrations, afin de trouver la meilleure formulation qui donne l'effet stabilisant le plus puissant sur le virus rabique ERA/Vero.
4. Il serait intéressant d'étendre cette étude à d'autres souches rabiques vaccinales (LPS, CVS, PM, Fleury,...ect), afin de déterminer la souche la plus stable dans les fortes températures et donc la plus commode pour la production de vaccins antirabiques thermostable dans les conditions de la pratique.
5. Il serait également intéressant d'orienter cet essai vers l'étude du vaccin antirabique destiné à la voie orale.
6. Essai d'isolement ou de sélection des souches thermorésistantes (Mutants thermostables) obtenues après 7j d'incubation à 37°C. L'isolement, la purification puis leur culture sur un support cellulaire permet la production de vaccins antirabiques à base de souches thermostables.

## **Références bibliographiques**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Abdul-Fattah AM., Truong-Le V., Yee L., Pan E., Ao Y., Kalonia DS., Pikal MJ, 2007.** Drying-induced variations in physico-chemical properties of amorphous pharmaceuticals and their impact on stability II: Stability of a vaccine. *Pharm Res*, 24(4), 715-727.

**Abelseth MK., 1964.** Propagation of rabies virus in pig kidney cell culture. *Canadian Veterinary Journal*, 5, 85-87.

**Adebayo AA., Sim-Brandenburg JW., Emmel H., Olaleye DO., Niedrig N, 1998.** Stability of 17D yellow fever virus vaccine using different stabilizers. *Biologicals*, 26, 309-316.

**Albertini A., 2006.** Etude structurale de la nucléoprotéine du virus de la rage. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur de l'université Joseph Fourier en biologie structurale et nanobiologie. Grenoble I, 163 pages.

**Albertini AAV., Schoehn G., Ruigrok RWH, 2005.** Structures impliquées dans la réplication et la transcription des virus à ARN non segmenté de sens négatif. *Virologie*, 9(2), 83-92.

**Amorij JP., Huckriede A., Wilschut J., Frijlink HW., Hinrichs WLJ, 2008.** Development of stable influenza vaccine powder formulations: Challenges and possibilities. *Pharm Res*, 25(6), 1256-1273.

**Andrewes CH., Horstmann DM, 1949.** The susceptibility of viruses to ethyl ether. *J Gen Microbiol*, 3, 290.

**Arakawa T., Prestrelski SJ., Kenney WC., Carpenter JF, 1993.** Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv Drug Deliv Rev*, 10, 1-28.

**Asim M., Rashid A., Chaudhary AH, 2008.** Effect of various stabilizers on titre of lyophilized live attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine. *Pakistan Vet J*, 28(4), 203-204.

**Aubert M., 2003.** Du diagnostic de la rage vulpine à son élimination. Bilan de l'activité du Laboratoire d'études sur la rage et la pathologie des animaux sauvages de Nancy en matière de rage. *Bull Acad Vét France*, Tome 156, N°1, 5-14.

**Aubry P., Rotivel Y, 2001.** Rage. Encycl Méd Chir, Maladies Infectieuses, Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, 8-065-C-10, 16 pages.

**Barbour EK., Abdelnour A., Jirjis F., Faroon O., Farran MT, 2002.** Evaluation of 12 stabilizers in a developed attenuated *Salmonella* Enteritidis vaccine. Vaccine, 20, 2249-2253.

**Barme M., 1985.** Stabilizing agents for live viruses for preparing vaccines and stabilized vaccines containing said stabilizing agents. United States Patent, N°4500512, 1-8.

**Barreca D., Laganà G., Ficarra S., Tellone E., Leuzzi U., Magazù S., Galtieri A., Bellocco E, 2010.** Anti-aggregation properties of trehalose on heat-induced secondary structure and conformation changes of bovine serum albumin. Biophysical Chemistry, 147, 146-152.

**Beckert A., Geue L., Vos A., Neubert A., Freuling C., Müller T, 2009.** Genetic stability (in vivo) of the attenuated oral rabies virus vaccine SAD B19. Microbiol Immunol, 53, 16-21

**Bégué P., 2009.** La vaccination. 1<sup>ère</sup> partie : Principes généraux et calendrier vaccinal, Fiche technique, 1-6.

URL:<http://www.cespharm.fr/fr/content/download/19800/428269/file/la-vaccination-1-re-partie-principes-generaux-et-calendrier-vaccinal-fiche-technique-mise-a-jour-2011.pdf> (page consultée le 01/12/2009)

**Benmansour A., Brahim M., Tuffereau C., Coulon P., Lafay F., Flamand A, 1992.** Rapid sequence evolution of street rabies glycoprotein is related to the highly heterogeneous nature of the viral population. Virology, 187(1), 33-45.

**Bevilacqua S., Rabaud C., May T, 2004.** Rage. EMC-Médecine, 1, 388-392.

**Bourhy H., 2007.** De nouveaux obstacles au contrôle de la rage. Bull Acad Vét France, Tome 160, N°5, 383-388.

**Bourhy H., Reynes JM., Dunham EJ., Dacheux L., Larrous F., Huong VTQ., Xu G., Yan J., Miranda MEG., Holmes EC, 2008.** The origin and phylogeography of dog rabies virus. J Gen Virol, 89, 2673-2681.

**Brahimi M., Gaouaoui R., Guettache A., Issad M, 2010.** Vaccination antirabique des chats soumis à une cure de prednisone. Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie, 246 pages.

**Brandau DT., Jones LS., Wiethoff CM., Rexroad J., Middaugh CR, 2003.** Thermal stability of vaccines. *J Pharm Sci*, 92, 218-231.

**Braun LJ., Jezek J., Peterson S., Tyagi A., Perkins S., Sylvester D., Guy M., Lal M., Priddy S., Plzak H., Kristensen D., Chen D, 2009.** Characterization of a thermostable hepatitis B vaccine formulation. *Vaccine*, 27, 4609-4614.

**Brzózka K., Finke S., Conzelmann KK, 2005.** Identification of the rabies virus Alpha/Beta interferon antagonist : Phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*, 79 (12), 7673-7681.

**Burke C., Volkin D, 2001.** Stabilizers containing recombinant human serum albumin for live virus vaccines. United States Patent, N°6210683 B1, 1-13.

**Caron V., 2008.** Rage et milieu professionnel: où en est-on? Institut national de recherche et de sécurité, Documents pour le Médecin du travail, N°114, 2<sup>ème</sup> trimestre, 291-294.

URL:[http://www.inrs.fr/htm/rage\\_et\\_milieu\\_professionnel\\_ou\\_en\\_est-on.html](http://www.inrs.fr/htm/rage_et_milieu_professionnel_ou_en_est-on.html)(page consultée le 15/10/2010)

**Carpenter JF., Pikal MJ., Chang BS., Randolph TW, 1997.** Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. *Pharm Res*, 14, 969-975.

**Celis E., Ou D., Dietzschold B., Koprowski H, 1988.** Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from human vaccine recipients. *J Virol*, 62(9), 3128-3134.

**Chen D., Kapre S., Goel A., Suresh K, Beri S., Hickling J., Jensen J., Lal M., Preaud JM., LaForce M., Kristensen D, 2010.** Thermostable formulations of a hepatitis B vaccine and a meningitis A polysaccharide conjugate vaccine produced by a spray drying method. *Vaccine*, 28, 5093-5099.

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

**Chen TF., Jang JW., Miller JA, 2008.** Stable and filterable enveloped virus formulations. Patent Application publication, United States Patent, N°0166784 A1, 1-8.

**Chun BH., Lee YK., Lee BC., Chung N, 2004.** Development of a varicella virus vaccine stabilizer containing no animal-derived component. *Biotechnology Letters*, 26, 807-812.

**Clark HF., Wiktor TJ, 1972.** In: Collard L, 2006. Apport de la biologie moléculaire a la taxinomie et a l'épidémiologie des virus rabiques. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 186 pages.

**Cleaveland S., Kaare M., Knobel D., Laurenson MK, 2006.** Canine vaccination-Providing broader benefits for disease control. *Vet Microbiol*, 117, 43-50.

**Contorni M., Massimo M, 2010.** Vaccines comprising aluminium adjuvants and histidine. United States Patent, N° 7754218 B2, 1-16.

**Costa WA., Cunha RS., Bolzan VL., Silva ACR., Caporale GMM., Chaves LB., Oselka GW., Junqueira DA., Panachão MRI., Dias RA., Takaoka NY, 2007.** Immunogenicity and safety of a new Vero cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*, 25 ,8140-8145.

**Cox JH., Dietzschold B., Schneider LG, 1977.** Rabies virus glycoprotein II. Biological and serological characterization. *Infection and Immunity*, 16 (3), 754-759.

**Crowe JH., Carpenter JF., Crowe LM, 1998.** The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*, 60, 73-103.

**Dodet B., Adjogoua EV., Aguemon AR., Baba BA., Adda SB., Boumandouki P., Bourhy H., Brahimi M., Briggs D., Diallo MK., Diarra L., Diop B et al., 2010.** Lutte contre la rage en Afrique : Du constat à l'action. *Bull Soc Pathol Exot*, 103, 51-59.

**Draper DE., Grilley D., Soto AM, 2005.** Ions and RNA folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 34, 221-243.

**Duflot P., Boit B., Lefevre P., Lis J, 2009.** Granulated sorbitol and process for its preparation. United States Patent, N°0324794 A1, 1-9.

**Dureux JB., 1974.** La rage. Expansion Scientifique Française Ed, Paris, 215 pages.

**Edwards AD., Slater NKH, 2008.** Formulation of a live bacterial vaccine for stable room temperature storage results in loss of acid, bile and bile salt resistance. *Vaccine* 26,5675-5678.

**Faber M., Faber ML., Li J., Preuss MAR., Schnell MJ., Dietzschold B, 2007.** Dominance of a nonpathogenic glycoprotein gene over a pathogenic glycoprotein gene in rabies virus. *J Virol*, 81(13), 7041-7047.

**Faber M., Li J., Kean RB., Hooper DC., Alugupalli KR., Dietzschold B, 2009.** Effective preexposure and postexposure prophylaxis of rabies with a highly attenuated recombinant rabies virus. PNAS, 106 (27), 11300-11305.

**Fanget B., Francon A, 2001.** Stabilizers for live vaccines. United States Patent, N°6231860 B1, 1-4.

**Fehlner-Gardiner C., Nadin-Davis S., Armstrong J., Muldoon F., Bachmann P., Wandeler A, 2008.** ERA vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989–2004. J Wildl Dis, 44(1), 71-85.

**Fenje P., 1960.** Propagation of rabies virus in cultures of hamster kidney cells. Canadian J Microbiol, 6, 479-484.

**Ferreira E., Mendes YS., Silva JL., Galler R., Oliveira AC., Freire MS., Gaspar LP, 2009.** Effects of hydrostatic pressure on the stability and thermostability of poliovirus: A new method for vaccine preservation. Vaccine, 27, 5332-5337.

**Finke S., Brzózka K., Conzelmann KK, 2004.** Tracking fluorescence-labeled rabies virus: Enhanced green fluorescent protein-tagged phosphoprotein P supports virus gene expression and formation of infectious particles. J Virol, 78(22) 12333-12343.

**Fischer L., 2003.** Les nouvelles technologies vaccinales. Bull Acad Vét France, Volume 156, N°3, 53-57.

**Flamand A., Raux H., Gaudin Y., Ruigrok RW, 1993.** Mechanisms of rabies virus neutralization. Virology, 194, 302-313.

**Fleury HJA., 2002.** Virologie humaine connaissances et pratique. 4<sup>ème</sup> Edition, Elsevier Masson, Paris, 245 pages.

**Fooks AR., Johnson N., Brookes SM., Parsons G., McElhinney LM, 2003.** Risk factors associated with travel to rabies endemic countries. J Appl Microbiol, 94, 31-36.

**Franka R., Wu X., Jackson FR., Velasco-Villa A., Palmer DP., Henderson H., Hayat W., Green DB., Blanton JD., Greenberg L., Rupprecht CE, 2009.** Rabies virus pathogenesis in relationship to intervention with inactivated and attenuated rabies vaccines. Vaccine, 27, 7149-7155.

**Friede M., Aguado MT, 2005.** Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 325-331.

**Galazka A., Milstien J., Zaffran M, 1998.** Thémostabilité des vaccins. Programme mondial des vaccins et vaccination, OMS, 66 pages.

**Gaudin Y., Tuffereau C., Durrer P., Flamand A., Ruigrok RWH, 1995.** Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation. *J Virol*, 69(9), 5528-5534.

**Graf LS., Cartier JR, 2003.** Utilisation de tréhalose pour stabiliser un vaccin liquide. Fascicule de Brevet Européen, N°1163008 B1, 1-6.

**Grainger CI, 2007.** Stabilisation of viral microparticles. United States Patent, N°0098740 A1, 1-9.

**Guérin N., 2005.** Vaccinations Immunizations. *EMC-Pédiatrie*, 2, 65-95.

**Guérin N., 2007.** Histoire de la vaccination : de l'empirisme aux vaccins recombinants. *La Revue de médecine interne*, 28, 3-8.

**Hemachudha T., Wacharapluesadee S., Laothamatas J., Wilde H, 2007.** Rabies virus and pathogenesis of rabies. *Infectious Diseases Journal of Pakistan*, 69-74.

**Hooper DC., 2005.** The role of immune responses in the pathogenesis of rabies. *J NeuroVirology*, 11, 88-92.

**Hummeler K., Koprowski H., Wiktor TJ., 1967.** Structure and development of rabies virus in tissue culture. *J Virol*, 1(1), 152-170.

**Ikizler MR., Wright PF, 2002.** Thermostabilization of egg grown influenza viruses. *Vaccine*, 20, 1393-1399.

**IPA., 2009.** Rapport d'activité. 296 pages.

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

**Jain NK., Roy I, 2008.** Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*, 18, 24-36.

**Johnson N., Cunningham AF., Fooks AR, 2010b.** 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, 2010a.** Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin. *Vet Microbiol*, 142, 151-159.

**JORA, 1995.** Décret exécutif N°95-66 du 22 février 1995 fixant la liste des maladies animales à déclaration obligatoire et les mesures générales qui leur sont applicables. Arrêté interministériel du 17 juillet 1995 relatif aux mesures sanitaires applicables à la rage animale.

**Kaplan C., 1968.** The influence of some metal ions and pH on the inactivation of vaccinia virus by heat. *J Gen Microbiol*, 31,311-314.

**Kaplan MM., Koprowski H, 1974.** La rage : technique de laboratoire. 3<sup>ème</sup> Ed, OMS, Genève, 379 pages.

**Kissi B., Badrane H., Audry L., Lavenu A., Tordo N., Brahim M., Bourhy H, 1999.** Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. *J Gen Virol*, 80, 2041-2050.

**Knezevic I., 2009.** Stability evaluation of vaccines : WHO approach. *Biologicals*, 37,357-359.

**Knobel DL., Cleaveland S., Coleman PG., Fèvre EM., Meltzer MI., Miranda MEG., Shaw A., Zinsstag J., Meslin FX, 2005.** Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull WHO*, 83 (5), 360-368.

**Koldajew B., Pikul N, 1934.** Ueber den Enflub der H-ionenkonzentration auf des Virus der Tollwut. *Zbl Bakt* ,131,6.

**Koprowski H, 2009.** Rabies in the face of the 21st century. *Zoonoses and Public Health*, 56, 258–261.

**Koyama K ., Osame J, 1999.** Stabilized live vaccine. United States Patent, N°5948411, 1-10.

**Krämer B., Schildger H., Behrendorf-Nicol HA., Hanschmann KM., Duchow K, 2009.** The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines. *Biologicals*, 37, 119-126.

**Krenn B., Wolschek M., Romanova J., Egorov A., Nakowitsch S, 2010.** Method for production of pH stable enveloped viruses. United States Patent, N°0172934 A1, 1-16.

**Kurz M., 2008.** Compatible solute influence on nucleic acids: Many questions but few answers. *Saline Systems*, 4(6), 1-14.

**Kuwert E., Liepenow W, 1959.** Die Stabilität des tollwut virus bei verschiedenen H-Ionenkonzentration verschiedenen temperaturen und formaldehydewirkung. *Arch exp Vet med*, 13, 335.

**Lafon M., 2005.** Rabies virus receptors. *J NeuroVirol*, 11, 82-87.

**Lahaye X., Vidy A., Pomier C., Obiang L., Harper F., Gaudin Y., Blondel D, 2009.** Functional characterization of negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J Virol*, 83(16), 7948-7958.

**Lawson KF., Black JG., Charlton KM., Johnston DH., Rhodes AJ, 1987.** Safety and immunogenicity of a vaccine bait containing ERA® strain of attenuated rabies virus. *Can J Vet Res*, 51, 460-464.

**Lepine P., Gamet A, 1969.** La rage .Les maladies animales à virus. L'Expansion Editeur, Paris, 129 pages.

**Levin A., Levin C., Kristensen D., Matthias D., 2007.** An economic evaluation of thermostable vaccines in Cambodia, Ghana, and Bangladesh. *Vaccine*, 25(39-40), 6945-6957.

**Liu J., Wang P., Li G., Xie B., Song Z., Li S., Liu J., Yu Y., Zhang XG., Liang B., Liu L., Wang W., Zhang L., Xue Y., Li J., Li Y., Lin H., Wan Z, 2005.** Freeze-dried hepatitis A attenuated live vaccine and its stabilizer. United States Patent, N°6884422 B1, 1-7.

**Lubroth J., Rweyemamu MM., Viljoen G., Diallo A., Dungu B., Amanfu W, 2007.** Veterinary vaccines and their use in developing countries. *Rev sci tech Off int Epiz*, 26(1), 179-201.

**Majer M., Herrmann A., Hilfenhaus J., Reichert E., Mauler R., Hennesen W, 1976.** Freeze-drying of a purified human diploid cell rabies vaccine. *Dev Biol Stand*, 36, 285-289.

**Makino S., Sasaki K., Nakagawa M, 1991.** Stabilized live attenuated vaccine and its production. United States Patent, N°4985244, 1-6.

- Malerczyk C., Selhorst T., Tordo N., Moore S., Müller T, 2009.** Antibodies induced by vaccination with purified chick embryo cell culture vaccine (PCECV) cross-neutralize non-classical bat lyssavirus strains. *Vaccine*, 27, 5320-5325.
- Mallik S., Mandal PK., Chatterjee C., Ghosh P., Manna N., Chakrabarty D., Bagchi SN., Dasgupta S, 2011.** Assessing cold chain status in a metro city of India: an intervention study. *African Health Sciences*, 11(1),128-133.
- Mammette A., 2002.** *Virologie médicale*. Presses Universitaires de Lyon, 798 pages.
- McElhinney LM., Fooks AR., Radford AD, 2008.** Diagnostic tools for the detection of rabies virus. *EJCAP* , 18(3), 224-231.
- Melnick JL., 1989.** Vaccins viraux : principes et perspectives. *Bulletin OMS*, 67(3), 253-261.
- Ménager P., Roux P., Mégret F., Bourgeois JP., Le Sourd AM., Danckaert A., Lafage M., Préhaud C., Lafon M, 2009.** Toll-like receptor 3 (TLR3) plays a major role in the formation of rabies virus negri bodies. *PLoS Pathogens*, 5(2), 1-15.
- Meslin FX., Kaplan MM., Koprowski H, 1999.** *La rage: technique de laboratoire*. 4<sup>ème</sup> Ed, OMS, Genève, 485 pages.
- Metallaoui A., 2009.** Renforcement de la surveillance et des systèmes d’alerte pour la fièvre catarrhale ovine, la fièvre du Nil Occidental et la rage au Maroc, en Algérie et en Tunisie. *Projet GCP/RAB/002/FRA*, FAO, 32 pages.  
URL: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/ak149f/ak149f00.pdf> (page consultée le 03/12/2009)
- Michalski F., Parks NF., Sokol F., Clark HF, 1976.** Thermal Inactivation of rabies and other rhabdoviruses: Stabilization by the chelating agent ethylenediaminetetraacetic acid at physiological temperatures. *Infect Immun*, 14(1), 135-143.
- Mobest H., 1959.** Über den einfluss verschiedener verdünnungsmittel auf die infektiosität von virus fixe suspension. *Zentbl Bakt Parasitkde (Abt. I, Orig)* ,174, I65.
- Monath TP., 1996.** Stability of yellow fever vaccine. *Dev Biol Stand*, 87,219-225.

**Moscou K., 2007.** La chaîne du froid. Coin technipharm FC, Programme national de formation continue destiné aux assistants techniques en pharmacie 1 UFC, 1-4.

URL: [http://www.tevacanada.com/Accueil/Ressources/Assistants-techniques/Formation-continue/Archive/La-chaine-du-froid---janvier\\_fevrier--07.aspx](http://www.tevacanada.com/Accueil/Ressources/Assistants-techniques/Formation-continue/Archive/La-chaine-du-froid---janvier_fevrier--07.aspx)(page consultée le 17/11/2009)

**Nadin-Davis SA, 2010.** Rabies : Virus and Disease. eLS. Centre of Expertise for Rabies, Ottawa Laboratory (Fallowfield), Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario, Canada.

**Nagarajan T., Nagendrakumar SB., Mohanasubramanian B., Rajalakshmi S., Hanumantha NR., Ramya R., Thiagarajan D., Srinivasan VA, 2009.** Phylogenetic analysis of nucleoprotein gene of dog rabies virus isolates from Southern India. *Infect Genet Evol*, 9, 976-982.

**Nicholson KG., 1990.** Modern vaccines: Rabies, *Lancet*, 19(335), 1201-1205.

**Oberreither M., Tauer C., Falkner FG, 2010.** Vaccine formulations and uses thereof. United States Patent, N°0124557 A1, 1-10.

**Ohtake S., Martin RA., Yee L., Chen D., Kristensen DD., Lechuga-Ballesteros D., Truong-Le V, 2010.** Heat-stable measles vaccine produced by spray drying. *Vaccine* 28, 1275-1284.

**OIE., 2005.** Manuel terrestre de l'OIE. Chapitre 2. 2. 5, Rage, 369-389.

URL: [http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/pdf\\_fr/Chapitre%20final05%202.2.5\\_Rage.pdf](http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/pdf_fr/Chapitre%20final05%202.2.5_Rage.pdf)  
(page consultée le 24/09/2010)

**OMS., 1973.** Comité OMS d'experts de la rage. Série de rapports techniques, Sixième rapport ,60 pages.

**OMS., 1984.** Comité OMS d'experts de la rage. Série de rapports techniques ,Septième rapport, 116 pages.

**OMS., 1988.** Activité initiale et stabilité de différents vaccins antirabiques modernes à usage vétérinaire. *Rab Res*, 8 pages.

**OMS., 1990.** Réunion OMS sur la lutte contre la rage dans les pays Magrébins. 33 pages.

**OMS., 2000.** Informations complémentaires sur la sécurité des vaccins. Deuxième partie : Fréquence de base des manifestations postvaccinales indésirables, 116 pages.

URL: <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF00/www584.pdf> (page consultée le 18/12/2009).

**Peetermans J., 1996.** Factors affecting the stability of viral vaccines. *Dev Biol Stand*, 87, 97-101.

**Peetermans J., Colinet G., Bouillet A., D'Hondt E., Stephenne J,1976.** Stability of live, freeze-dried virus vaccines. *Dev Biol Stand*, 36,291-296.

**Pfleiderer M., 2009.** Stability of vaccines - Bridging from stability data to continuous safety and efficacy throughout shelf life - An always reliable approach ? *Biologicals*, 37, 364-368.

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

URL: <http://www.alis-france.com/download/constituantsvaccins.pdf> (page consultée le 15/12/2009)

**Pinteric L., Fenje P., Almeida JD, 1963.** The visualization of rabies virus in mouse brain. *Virology*, 20, 208.

**Plotkin SA., 2000.** Rabies. *CID*, 30,4–12.

**Rapp F., Butel JS., Wallis C, 1965.** Protection of Measles virus by sulfate ions against thermal inactivation. *J Bacteriol*, 90(1), 132-135.

**Reed SG., Bertholet S., Coler RN., Friede M, 2008.** New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*, 30 (1), 23-32.

**Rexroad J., Wiethoff CM., Jones LS., Middaugh CR, 2002.** Lyophilization and the thermostability of vaccines. *Cell Preservation Technology*, 1(2), 91-104.

**Reynolds B., Izard RS, 2005.** Vaccine stabilizer method. United States Patent, N°0186221 A1, 1-8.

**Rupprecht CE., Gibbons RV, 2004.** Prophylaxis against rabies. *N ENGL J MED*, 351(25), 2626- 2635.

**Rupprecht CE., Briggs D., Brown CM., Franka R., Katz SL., Kerr HD., Lett SM., Levis R., Meltzer MI., Schaffner W., Cieslak PR, 2010.** Use of a reduced (4-Dose) vaccine schedule for postexposure prophylaxis to prevent human rabies. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, *MMWR*, 59(2), 1-12.

**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.

**Sarkar J., Sreenivasa BP., Singh RP., Dhar P., Bandyopadhyay SK, 2003.** Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine. *Vaccine*, 21, 4728–4735.

**Sastre P., Oomens AGP., Wertz GW, 2007.** The stability of human respiratory syncytial virus is enhanced by incorporation of the baculovirus GP64 protein. *Vaccine*, 25, 5025–5033.

**Schiraldi C., Di Lernia I., De Rosa M, 2002.** Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends in Biotechnology*, 20, 10, 420-425.

**Schnell MJ., McGettigan JP., Wirblich C., Papaneri A, 2010.** The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nature Rev Microbiol*, 8, 51-61.

**Schofield TL., 2009.** Maintenance of vaccine stability through annual stability and comparability studies. *Biologicals*, 37, 397-402.

**Sheets R., 2000.** History and Characterization of the Vero cell line. Report for the Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee, 12 pages.

URL: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/backgrd/3616b1a.pdf> (page consultée le 05/07/2010)

**Sokol F., Schlumberger HD., Wiktor TJ., Koprowski H., Hummeler K, 1969.** Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus. *Virology*, 38(4), 651-665.

**Sood DK., Aggarwal RK., Sharma SB., Sokhey J., Singh H, 1993.** Study on the stability of 17D-204 yellow fever vaccine before and after stabilization. *Vaccine*, 11, 1124-1128.

**Stinchcomb DT., Osorio JE., Wiggan O, 2008.** Methods and compositions for live attenuated viruses. United States Patent, N°0248551A1, 1-23.

**Thoulouze MI., Lafage M., Schachner M., Hartmann U., Cremer H., Lafon M, 1998.** The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol*, 72(9), 7181-7190.

**Tiembré I., Dagnan S., Douba A., Adjogoua EV., Bourhy H., Dacheux L., Kouassi L., Dosso M., Odehoury-Koudou P, 2010.** Surveillance épidémiologique de la rage humaine dans un contexte d'endémie de rage canine en Cote d'Ivoire. *Médecine et maladies Infectieuses*, 40, 398-403.

**Toma B., Koutchoukali MA, 1985.** In : Pasteur et la rage. Informations techniques des services vétérinaires, Paris, 320 pages.

**Tordo N., Poch O., Ermine A., Keith G., Rougeon F, 1986.** Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc Natl Acad Sci*, 83, 3914-3918.

**Toriniwa H., Komiya T, 2008.** Long-term stability of Vero cell-derived inactivated japanese encephalitis vaccine prepared using serum-free medium. *Vaccine*, 26, 3680-3689.

**Tortora GJ., Funke BR., Case CL, 2010.** Microbiology An introduction. 10<sup>ème</sup> Ed, Pearson Ed, USA, 812 pages.

**Truong-Le V., Yee L., Lechuga-Ballesteros D., Ohtake S, 2010.** Formulations for preservation of rotavirus. United States Patent, N°0226939 A1, 1-13.

**Tuffereau C., Schmidt K., Langevin C., Lafay F., Dechant G., Koltzenburg M, 2007.** The rabies virus glycoprotein receptor p75<sup>NTR</sup> is not essential for rabies virus infection. *J Virol*, 81(24), 13622-13630.

**Turner GS., Kaplan C, 1967.** Some properties of fixed rabies virus. *J Gen Virol*, 1, 537-551.

**Volkin DB., Sheu SP., Burke CJ, 2001.** Stabilizers for lyophilized vaccines. United States Patent, N°6290967 B1, 1-26.

**Vellom DC., Woiszwilllo JE., Woiszwilllo A., O'Neil D., Woiszwilllo J., Woiszwilllo C., DeGeorge P., Ciarametaro P, 2010.** Stabilization of vaccines by lyophilization. United States Patent, N°0247573 A1, 1-21.

**Verdier F., Barrow PC., Burge J, 2003.** Reproductive toxicity testing of vaccines. *Toxicology*, 185, 213-219.

**Vernon SK., Neurath AR., Rubin BA, 1972.** Electron microscopic studies on the structure of rabies virus. *Journal of Ultrastructure Research*, 41(1-2), 29-42.

**Wallis C., Melnick JL., Rapp F, 1965.** Different effects of MgCl<sub>2</sub> and MgSO<sub>4</sub> on the thermostability of viruses. *Virology*, 26, 4, 694-699

**Warrell MJ., Warrell DA, 2004.** Rabies and other lyssavirus diseases. *The Lancet*, 363, 959-969.

**Watkinson A., Duchars M, 2010.** Stable vaccine compositions and methods of use. United States Patent, N°0183675 A1, 1-12.

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

**WHO., 2009.** Guidelines on stability evaluation of vaccines. *Biologicals*, 37, 424-434.

**WHO., 2010.** Rabies vaccines: WHO position paper–Recommendations. *Vaccine*, 28, 7140-7142.

**Wiktor TJ., Aaslestad HG., Kaplan MM, 1972.** Immunogenicity of rabies virus inactivated by β-propiolactone, acetyleneimine, and ionizing irradiation. *Appl Microbiol*, 23(5), 914-918.

**Woese C., 1960.** Thermal inactivation of animal viruses. *Ann NY Acad Sci*, 83,741.

**Wolff L., Flemming J., Schmitz R., Gröger K., Goso C., Müller-Goymann CC,2009.** Comparative stability study of lyophilized aluminium hydroxide adjuvanted vaccine formulations containing a monoclonal antibody as a model antigen and methods used for their characterisation. *Colloids and Surfaces A : Physicochem Eng Aspects*, 339, 82-93.

**Wolff L., Flemming J., Schmitz R., Gröger K., Müller-Goymann C, 2008.** Protection of aluminum hydroxide during lyophilisation as an adjuvant for freeze-dried vaccines. *Colloids and Surfaces A : Physicochem Eng Aspects*, 330, 116-126.

**Wunner WH., Pallatroni C., Curtis PJ, 2004.** Selection of genetic inhibitors of rabies virus. *Arch Virol*, 149, 1653-1662.

**Yannarell DA., Goldberg KM, Hjorth RN, 2002.** Stabilizing cold-adapted influenza virus vaccine under various storage conditions. *J Virol Meth*, 102, 15-25

**Zhang Y., Ji B., Ling P., Zhang T, 2007.** Trehalose and hyaluronic acid coordinately stabilized freeze-dried pancreatic kininogenase. *Eur J Pharm Biopharm*, 65, 18-25.

# **Annexes**

**ANNEXE I****Tableau 11 : Les surnageants viraux rabiques utilisés (Numéros et dates de récolte, le titre viral initial en  $\log_{10}1/DL_{50}$ )**

N° de test	N° de récolte du surnageant viral	La date de récolte du surnageant viral	Le titre initial
1	EVS 10	10/01/2010	5,75
2	EVS 12	12/01/1010	6,00
3	EVS 13	13/01/2010	6,50
4	EVS 6	26/01/2010	6,25
5	EVS 6	03/01/2010	6,25
6	EVS 6	28/01/2010	5,75
7	EVS 6	14/02/2010	6,00
8	EVS 8	16/02/2010	6,50
9	EVS 10	18/02/2010	6,33
10	EVS 6	25/02/2009	6,33
11	EVS 6	02/03/2010	6,33
12	EVS 6	04/03/2010	6,33
13	EVS 6	30/03/2010	6,33
14	EVS 6	30/03/2010	6,33
15	EVS 6	01/04/2010	5,00
16	EVS 10	25/04/2010	6,33
17	EVS 11	29/04/2010	5,50
18	EVS 11	09/05/2010	5,50
19	EVS 13	29/05/2010	5,50
20	EVS 6	13/09/2009	6,33
21	EVS 6	23/05/2010	6,33
22	EVS 6	11/05/2010	6,33
23	EVS 8	13/05/2010	6,33
24	EVS 6	08/06/2010	6,33
25	EVS 8	10/06/2010	6,33
26	EVS 10	13/06/2010	6,33
27	EVS 6	15/06/2010	6,33
28	EVS 10	06/09/2009	6,50

---

<b>N° de test</b>	<b>N° de récolte du surnageant viral</b>	<b>La date de récolte du surnageant viral</b>	<b>Le titre initial</b>
29	EVS 6	28/12/2009	6,33
30	EVS 6	18/10/2009	6,33
31	EVS 8	21/05/2008	6,33
32	EVS 10	22/10/2009	6,33
33	EVS 6	29/06/2008	6,33
34	EVS 6	02/03/2009	6,33
35	EVS 7	16/03/2010	6,50
36	EVS 13	13/09/2010	6,33
37	EVS 6	28/12/2010	6,33
38	EVS 8	30/12/2010	6,33
39	EVS 10	13/01/2010	6,33
40	EVS 6	15/01/2010	6,33
41	EVS 8	04/01/2011	5,50
42	EVS 10	06/01/2011	5,67
43	EVS 6	09/01/2011	6,33
44	EVS 6	15/01/2011	6,33
45	EVS 8	01/02/2011	6,33
46	EVS 10	28/02/2011	6,33
47	EVS 6	03/03/2011	5,83
48	EVS 6	06/03/2011	6,17
49	EVS 8	08/03/2011	5,67

**ANNEXE II : Milieu de culture et réactifs****Milieu de culture cellulaire DMEM :**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
<b>L-Arginine.....</b>	<b>0,084</b>
<b>L-Cystine.....</b>	<b>0,0626</b>
<b>L-Glutamine.....</b>	<b>0,584</b>
<b>Glycine.....</b>	<b>0,03</b>
<b>L-Histidine.....</b>	<b>0,042</b>
<b>L-Isoleucine.....</b>	<b>0,105</b>
<b>L-Leucine.....</b>	<b>0,105</b>
<b>L-Lysine.....</b>	<b>0,146</b>
<b>L-Méthionine.....</b>	<b>0,03</b>
<b>L-Phénylalanine.....</b>	<b>0,066</b>
<b>L-Sérine.....</b>	<b>0,042</b>
<b>L-Thréonine.....</b>	<b>0,095</b>
<b>L-Tryptophane.....</b>	<b>0,016</b>
<b>L-Tyrosine.....</b>	<b>0,10379</b>
<b>L-Valine.....</b>	<b>0,094</b>
<b>Choline Chloride.....</b>	<b>0,004</b>
<b>Acide Folique.....</b>	<b>0,004</b>
<b>Myo-Inositol.....</b>	<b>0,0072</b>
<b>Niacinamide.....</b>	<b>0,004</b>
<b>Acid D-Pantothénique hemicalcium.....</b>	<b>0,004</b>
<b>Pyridoxal.....</b>	<b>0,004</b>
<b>Riboflavine.....</b>	<b>0,0004</b>
<b>Thiamine.....</b>	<b>0,004</b>
<b>Chlorure de Calcium.....</b>	<b>0,2</b>
<b>Nitrate Ferrique.....</b>	<b>0,0001</b>
<b>Sulfate de Magnésium.....</b>	<b>0,09767</b>
<b>Chlorure de Potassium.....</b>	<b>0,4</b>
<b>Chlorure de Sodium.....</b>	<b>6,4</b>
<b>Phosphate de Sodium Monobasique.....</b>	<b>0,109</b>

<b>Glucose</b> .....	<b>4,5</b>
<b>Rouge de Phénol</b> .....	<b>0,0159</b>
<b>Acide Pyruvique</b> .....	<b>0,11</b>

### Préparation du DMEM :

- Réalisation de la solubilisation de la poudre du milieu de culture DMEM dans de l'eau distillée stérile (qsp pour 10 litres).
- Rajouter une quantité définie de bicarbonate de sodium, après agitation le pH de la solution basique au départ sera ramené vers un ph de 7,1-7,2, par la solution de 0,1 N de HCl et contrôlé par un pH mètre.
- Le milieu est filtré par une filtration stérilisante (0,22µm).
- Rajouter dans le DMEM :
  - Un mélange d'antibiotiques : Pénicilline G, Streptomycine, Amphotericine B (antifongique).
  - Le sérum de veau fœtal (SVF) à des proportions allant de 3% (pour l'infection) à 8% (pour le milieu d'entretien des cellules).

### Tampon ENDERS :

Composition	g/10l
<b>Phosphate de sodium monosodique (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O)</b> .....	<b>624,00</b>
<b>Chlorure de sodium (NaCl)</b> .....	<b>585,00</b>
<b>Soude (NaOH)</b> .....	<b>122,00</b>
<b>Eau permuté q.S.p</b> .....	<b>10 litres</b>
<b>pH =7, 2</b>	

### Tampon PBS :

Composition	g/l
<b>Chlorure de magnésium (MgCl)</b> .....	<b>0,04683</b>
<b>Chlorure de potassium (KCl)</b> .....	<b>0,2</b>
<b>Phosphate de potassium monobasique (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b> .....	<b>0,2</b>
<b>Chlorure de sodium (NaCl)</b> .....	<b>8,0</b>

<b>Phosphate de sodium dibasique(<math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math>)</b> .....	<b>1,15</b>
<b>Acide pyruvique</b> .....	<b>0,036</b>
<b>Streptomycine sulfate</b> .....	<b>0,05</b>
<b>Chlorure de calcium (<math>\text{CaCl } 2\text{H}_2\text{O}</math>)</b> .....	<b>0,133</b>
<b>Pénicilline G</b> .....	<b><math>1 \times 10^6</math> unités</b>

N

**Décret exécutif N°95-66 du 22 février 1995 fixant la liste  
des maladies animales à déclaration obligatoire et  
les mesures générales qui leur sont applicables .**

Le chef du Gouvernement ;

Sur le rapport du ministère de l'agriculture ;

Vu la constitution, notamment ses articles 81-4 ° et 116 (alinéa 2) ;

Vu la plate-forme portant consensus national sur la période transitoire ;

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

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

Vu la loi N°90-08 du 7 avril 1990 relative à la commune ;

Vu la loi N°90-09 du 7 avril 1990 relative à la wilaya ;

Vu le décret législatif N° 93-01 du 19 janvier 1993 portant loi de finances pour 1993, notamment son article 137

Vu le décret N° 84-379 du 15 décembre 1984 fixant les statuts particuliers des médecins vétérinaires ;

Vu le décret N°84-380 du 15 décembre 1984 fixant les statuts particuliers des médecins vétérinaires spécialistes ;

Vu le décret présidentiel N°94-92 du 11 avril 1994 portant nomination du chef du Gouvernement ;

Vu le décret présidentiel N° 94-93 du 15 avril 1994 portant nomination des membres du Gouvernement ;

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

Vu le décret exécutif N° 90-12 du 1<sup>er</sup> janvier 1990 fixant les attributions du ministre de l'agriculture ;

**Décète :**

**Article.1<sup>er</sup>** - Le présent décret a pour objet de fixer en application de l'article 65 de la loi N°88-08 du 26 janvier 1988 susvisé, la liste des maladies animales à déclaration obligatoire, telles que définies en son article 64 et d'énoncer les mesures générales de prévention et de lutte qui leur sont applicables.

**Article 2.** - Les maladies animales à déclaration obligatoire sont les suivantes :

- § La fièvre aphteuse,
- § La peste bovine,
- § La péripneumonie contagieuse bovine,
- § La rage dans toutes les espèces,
- § La clavelée et variole caprine,
- § La maladie de New-Castle,
- § La peste aviaire,
- § La fièvre charbonneuse chez toutes les espèces de mammifères,
- § La fièvre catarrhale du mouton,
- § La tuberculose bovine,
- § La brucellose dans les espèces bovine, ovine et caprine,
- § L'anémie infectieuse des équidés,
- § La métrite contagieuse équine,
- § La dourine,
- § La morve,
- § La rhinotrachéite infectieuse bovine,
- § La leucose bovine enzootique,
- § *Cochliomyia hominivorax*
- § La campylobactériose génitale bovine,
- § La trichomonose bovine,
- § L'échinococcose/hydatidose,
- § La cysticerose,
- § Le charbon symptomatique,
- § L'avortement enzootique des brebis,

- § La gale des équidés,
- § La paratuberculose,
- § La fièvre Q,
- § La leptospirose bovine,
- § La bronchite infectieuse aviaire,
- § La maladie de Marek,
- § Le choléra aviaire,
- § La bursite infectieuse (maladie de Gumboro)
- § La variole aviaire,
- § Les salmonelloses aviaires à *Salmonella* : pullorum-gallinarum,
- § L'ornithose/psittacose,
- § Les leucoses aviaires,
- § La myxomatose,
- § La maladie hémorragique virale du lapin,
- § La tularémie,
- § La varroase des abeilles,
- § La loque, la nosérose et l'acarose des abeilles,
- § La variole cameline,
- § La trypanosomose des camelins à *T. evansi* (surra),
- § La leishmaniose,
- § La peste des petits ruminants,
- § L'encéphalopathie spongiforme des bovins,
- § La fièvre de la vallée du Rift,

**Article 3.** - Au sens du présent décret, il est entendu par mesures générales l'ensemble des dispositions à prendre dans le cadre de la prévention et de la lutte en cas d'apparition d'une ou plusieurs maladies à déclaration obligatoire.

Les mesures de prévention et de lutte spécifique à chacune des maladies à déclaration obligatoire, telles que définies à l'article 2 ci-dessus, font l'objet en tant que de besoin, d'arrêtés conjoints, du ministre de l'agriculture et des ministres concernés.

**Article 4.** - Un animal est déclaré atteint d'une maladie à déclaration obligatoire :

- Lorsqu'il manifeste des signes cliniques caractéristiques à une ou plusieurs maladies telles que prévues à l'article 2 ci-dessus.
- Lorsqu'il présente des lésions typiques d'une ou plusieurs maladies prévues à l'article 2 ci-dessus.
- Lorsque la maladie est diagnostiquée par un laboratoire agréé par le ministère de l'agriculture .

**Article 5.** - Un animal est suspect d'être atteint lorsqu'il présente des symptômes ou des lésions qui font suspecter la maladie mais peuvent être rattachés à d'autres maladies .

**Article 6.** - Un animal est considéré, au sens du présent décret, comme contaminé lorsqu'il ne présente aucun signe clinique d'une maladie obligatoire, mais qu'il est prouvé qu'il a été en contact avec des animaux atteints, des personnes ou des objets qui auraient été eux-mêmes en contact avec des animaux atteints .

**Article 7.** - Conformément aux dispositions des articles 66 et 68 de la loi N°88-08 du 26 janvier 1988 susvisée, toute personne physique ou morale qui détient ou garde un animal, le cadavre ou la carcasse d'un animal atteint ou suspect d'être atteint de l'une des maladies à déclaration obligatoire est tenue immédiatement d'informer le vétérinaire territorialement compétent où se trouve l'animal, ou le Président de l'assemblée populaire communale .

**Article 8.** - Le vétérinaire territorialement compétent informé est tenu de se rendre sans délai sur les lieux et de procéder à l'examen des animaux atteints ou suspects et des cadavres.

Il procède éventuellement à l'autopsie et/ou à tous les prélèvements nécessaires au diagnostic .

Les prélèvements doivent être expédiés à un laboratoire agréé par le ministère de l'agriculture .

Le vétérinaire prend immédiatement l'ensemble des mesures qu'il juge nécessaires pour éviter la propagation de la maladie notamment interdiction du déplacement hors de l'exploitation des animaux atteints ou suspects d'être atteints .

**Article 9.** - En cas de constatation de l'une des maladies visées à l'article 2 ci-dessus, le médecin vétérinaire doit en faire la déclaration à l'inspecteur vétérinaire de wilaya et à l'autorité vétérinaire nationale .

Cette déclaration est adressée également au Président de l'assemblée populaire communale du lieu d'apparition de la maladie dans la mesure où celle-ci doit être assujettie à des mesures spécifiques de lutte .

La déclaration est formulée sur un imprimé dont le modèle est fixé par le ministère de l'agriculture .

Dans le cas d'une maladie contagieuse apparaissant pour la première fois ou réapparaissant sur le territoire national, le vétérinaire est tenu d'en informer l'autorité vétérinaire nationale par le moyen approprié le plus rapide .

**Article 10.** - En cas d'apparition de maladie fortement contagieuse et/ou à propagation rapide le wali territorialement compétent est tenu de prendre un arrêté de déclaration d'infection qui énonce les dispositions à prendre .

L'arrêté doit comporter la déclaration de 3 zones concentriques, une zone de séquestration, une zone d'interdiction et/ou une zone d'observation .

**Article 11.** - La zone de séquestration comprend l'exploitation d'élevage ou les locaux où la maladie a été constatée .

Dans cette zone, la sortie et l'entrée des animaux et des produits pouvant véhiculer l'agent infectieux, sont interdites sauf dérogation spéciale délivrée par l'inspecteur vétérinaire de wilaya .

Cette interdiction est applicable aux véhicules et aux personnes, sauf celles qui ont la charge des soins des animaux .

Ces dernières ne peuvent quitter la zone de séquestration, qu'après des mesures strictes de désinfection .

Le fumier ne peut être enlevé de la zone de séquestration ni être utilisé, ni stocké à proximité *des points d'eau* .

Le matériel d'élevage et les objets pouvant véhiculer l'agent infectieux, tels que fouage, paille, litière, sacs, ne doivent pas quitter la zone de séquestration .

**Article 12.** - La zone d'interdiction comprend la bande périphérique à la zone de séquestration et ce, dans un rayon fixé par arrêté du wali pour chaque foyer déclaré, suivant la capacité de diffusion de la maladie et les particularités géographiques de cette zone .

Dans cette zone, il est procédé sous l'autorité du ou des présidents des assemblées populaires communales concernées par l'arrêté du wali, au recensement des cheptels sensibles .

Ceux-ci sont placés sous la surveillance sanitaire d'un vétérinaire dûment mandaté par l'inspecteur vétérinaire de wilaya .

-La circulation des animaux est interdite à l'intérieur de cette zone, sauf pour l'abattage. Les marchés, foires et autres rassemblements doivent être impérativement interdits ainsi que l'abreuvement aux points d'eau communs .

Lorsque les opérations de prophylaxie médicale sont ordonnées dans cette zone, elles doivent être exécutées sous la responsabilité d'un vétérinaire dûment mandaté par l'inspecteur vétérinaire de wilaya .

**Article 13.** - La zone d'observation comprend le territoire situé à la périphérie de la zone d'interdiction dans un rayon fixé selon les mêmes modalités que ci-dessus .

les mesures sanitaires applicables dans cette zone sont les suivantes :

- Recensement des animaux,
- Réglementation de la circulation des animaux,
- Réglementation des marchés, foires, expositions ou tout autre rassemblement.

**Article 14.** - La déclaration de l'une des maladies visées à l'article 2 du présent décret, entraîne l'application de tout ou d'une partie des mesures énumérées ci-après :

- Isolement, séquestration ou cantonnement,
- Recensement, identification et/ou marquage,
- Interdiction momentanée ou réglementation des mouvements et rassemblements d'animaux,
- Abattage,
- Destruction des cadavres,
- Traitement prophylactique,
- Désinfection,
- Indemnisation selon des conditions et modalités spécifiques à chaque maladie et ce, conformément à la législation en vigueur.

**Article 15.** - L'isolement a pour but de séparer les animaux atteints de maladie à déclaration obligatoire ou suspects d'en être atteints des autres animaux supposés sains .

Il peut se faire sous forme de séquestration ou de cantonnement .

La séquestration se fait sur le lieu même où se trouvent les animaux . Les animaux atteints ou suspects d'être atteints doivent être logés dans des bâtiments séparés n'ayant aucune communication avec ceux où sont hébergés les animaux supposés sains.

Les personnes ayant la charge des soins ou de la garde des animaux sont les seuls autorisés à pénétrer dans le local de séquestration .

Toute espèce autre que celles sensibles à la maladie déclarées doit être tenue enfermée .

Les animaux ne peuvent quitter le local de séquestration que pour être dirigés vers un abattoir ou clos d'équarrissage sous couvert d'un laissez-passer délivré par l'inspecteur vétérinaire de wilaya .

Le cantonnement est décidé, lorsque les conditions d'élevage ne permettent pas la séquestration dans un local fermé, des animaux atteints et des animaux suspects qui sont alors regroupés dans un enclos bien délimité et éloigné des parcours fréquentés par les animaux et les personnes .

**Article 16.** - Le recensement permet d'éviter toute dispersion d'animaux dans la zone infectée .

tous les animaux sensibles à la maladie lors de son apparition dans l'élevage, sont recensés et classés par catégorie (s) (contaminés ou sains) puis identifiés différemment par des moyens appropriés .

Les animaux recensés font l'objet d'un contrôle régulier par le vétérinaire mandaté durant la période de mise en quarantaine .

Les modalités d'identification des différentes catégories d'animaux sont fixés par arrêté du ministre de l'agriculture .

Le marquage est réservé aux animaux atteints ou contaminés destinés à l'abattage .

Il doit être effectué de manière indélébile par un procédé tel que le feu, les substances chimiques ou à l'aide d'une pince emporte-pièce .

Les modalités du marquage sont précisées dans les mesures sanitaires spécifiques à chaque maladie et ce, conformément à l'article 3 ci-dessus .

**Article 17.** - L'abattage sanitaire peut être rendu obligatoire et peut concerner tout ou une partie de l'effectif .

Les modalités de mise en œuvre des ordres d'abattage sanitaire sont fixées par le ministre de l'agriculture .

L'abattage peut être effectué sur place ou dans un établissement d'abattage . Il doit être effectué sous la surveillance d'un vétérinaire dûment mandaté par l'inspecteur vétérinaire de wilaya et donne lieu, à l'établissement d'un procès-verbal,

Le transfert vers l'établissement d'abattage ne peut être fait, qu'après marquage des animaux et sous couvert d'un laissez-passer délivré par l'inspecteur vétérinaire de wilaya ou son représentant dûment mandaté .

Le véhicule utilisé à cette fin doit être agréé par l'inspecteur vétérinaire de wilaya ou son représentant dûment mandaté et désinfecté après usage.

Le lieu d'abattage doit être obligatoirement désinfecté après l'élimination des animaux .

**Article 18.** - La destruction des cadavres d'animaux est confiée à un atelier d'équarissage agréé par l'inspecteur vétérinaire de wilaya .

Le transport de ces cadavres à l'atelier d'équarissage est effectué dans des véhicules étanches faciles à désinfecter .

En l'absence d'atelier d'équarissage, la destruction des cadavres, doit se faire par enfouissement ou incinération sous le contrôle de l'inspecteur vétérinaire de wilaya ou son représentant dûment mandaté .

L'enfouissement doit avoir lieu au niveau de l'exploitation infectée ou à défaut sur un terrain communal préalablement désigné à cet effet . Ce terrain doit être éloigné de toute habitation ou points d'eau, délimité par une clôture et interdit à l'accès des animaux .

L'enfouissement est réalisé à une profondeur de deux mètres environ et entre deux lits de chaux vive .

Le déterrement des cadavres d'animaux est interdit .

**Article 19.** - L'incinération consiste en la destruction des cadavres jusqu'à leur combustion complète, elle doit être réalisée dans un endroit éloigné des zones d'habitation .

Le propriétaire doit présenter à toute réquisition, le récépissé d'enlèvement des cadavres, délivré par l'équarrisseur ou le certificat d'enfouissement ou de destruction délivré par le vétérinaire mandaté pour le contrôle de cette opération .

**Article 20.** - Le traitement de certaines maladies contagieuses est interdit . Cette interdiction est précisée dans les mesures spécifiques à chaque maladie conformément à l'article 3 ci-dessus .

Pour les autres maladies, le traitement est laissé à l'appréciation du vétérinaire . Il est effectué aux frais de l'éleveur .

La vaccination, si elle n'est pas interdite, peut être rendue obligatoire ou facultative et concerne soit, les animaux contaminés soit, les animaux réceptifs séjournant dans le périmètre infecté. L'ordre de vaccination peut être donné par le ministre de l'agriculture . Elle est réalisée dans ce cas aux frais de l'Etat .

Si la vaccination est facultative, celle-ci doit se faire à la demande et aux frais du propriétaire des animaux .

**Article 21.** - La désinfection s'applique à tout ce qui peut receler et propager les germes de maladies contagieuses à déclaration obligatoire .

Elle doit être précédée obligatoirement par un nettoyage efficace .

Elle doit concerner les locaux d'élevage, les véhicules de transport, le matériel et d'une façon générale tout objet ayant été en contact avec les animaux malades ou contaminés et tous les produits en provenant .

Le personnel chargé des soins et de la surveillance des animaux est également tenu de se soumettre à des règles précises de désinfection .

**Article 22.** - La constatation de toute maladie citée à l'article 2 du présent décret, donne lieu à une enquête épidémiologique réalisée par l'inspecteur vétérinaire de wilaya ou par un vétérinaire dûment mandaté .

Dès sa première visite, le vétérinaire doit recueillir tous les renseignements nécessaires pour déterminer l'origine de la maladie, son mode de transmission et son mode de propagation .

Il doit rechercher, si des animaux, des objets, ou tout autre produit contaminés ou soupçonnés d'être contaminés sont sortis de l'exploitation infectée .

**Article 16.** - Le recensement permet d'éviter toute dispersion d'animaux dans la zone infectée .

tous les animaux sensibles à la maladie lors de son apparition dans l'élevage, sont recensés et classés par catégorie (s) (contaminés ou sains) puis identifiés différemment par des moyens appropriés .

Les animaux recensés font l'objet d'un contrôle régulier par le vétérinaire mandaté durant la période de mise en quarantaine .

Les modalités d'identification des différentes catégories d'animaux sont fixés par arrêté du ministre de l'agriculture .

Le marquage est réservé aux animaux atteints ou contaminés destinés à l'abattage .

Il doit être effectué de manière indélébile par un procédé tel que le feu, les substances chimiques ou à l'aide d'une pince emporte-pièce .

Les modalités du marquage sont précisées dans les mesures sanitaires spécifiques à chaque maladie et ce, conformément à l'article 3 ci-dessus .

**Article 17.** - L'abattage sanitaire peut être rendu obligatoire et peut concerner tout ou une partie de l'effectif .

Les modalités de mise en œuvre des ordres d'abattage sanitaire sont fixées par le ministre de l'agriculture .

L'abattage peut être effectué sur place ou dans un établissement d'abattage . Il doit être effectué sous la surveillance d'un vétérinaire dûment mandaté par l'inspecteur vétérinaire de wilaya et donne lieu, à l'établissement d'un procès-verbal,

Le transfert vers l'établissement d'abattage ne peut être fait, qu'après marquage des animaux et sous couvert d'un laissez-passer délivré par l'inspecteur vétérinaire de wilaya ou son représentant dûment mandaté .

Le véhicule utilisé à cette fin doit être agréé par l'inspecteur vétérinaire de wilaya ou son représentant dûment mandaté et désinfecté après usage.

Le lieu d'abattage doit être obligatoirement désinfecté après l'élimination des animaux .

**Article 18.** - La destruction des cadavres d'animaux est confiée à un atelier d'équarissage agréé par l'inspecteur vétérinaire de wilaya .

Le transport de ces cadavres à l'atelier d'équarissage est effectué dans des véhicules étanches faciles à désinfecter .

En l'absence d'atelier d'équarissage, la destruction des cadavres, doit se faire par enfouissement ou incinération sous le contrôle de l'inspecteur vétérinaire de wilaya ou son représentant dûment mandaté .

Il doit tenir informer l'inspecteur vétérinaire de wilaya de l'avancement de l'enquête et du résultat de ses investigations .

Un rapport doit être établi et transmis dès la fin de l'enquête, à l'inspecteur vétérinaire de wilaya et à l'autorité vétérinaire nationale .

**Article23.** - Lorsque toutes les mesures sanitaires prescrites ont été effectuées conformément aux dispositions réglementaires arrêtées, l'inspecteur vétérinaire de wilaya ou son représentant dûment mandaté effectue une dernière visite sanitaire . Il s'assure de l'extinction du foyer de la maladie et de l'exécution de toutes les mesures prescrites en particulier la désinfection terminale

A l'issue de cette visite, l'inspecteur vétérinaire de wilaya adresse un rapport au wali et à l'autorité vétérinaire nationale, proposant la levée de l'arrêté portant déclaration d'infection .

La levée de l'arrêté est prononcée au bout d'un délai variable défini pour chaque maladie .

Lorsqu'aucun délai n'est fixé dans les dispositions particulières, il est laissé à l'appréciation de l'inspecteur vétérinaire de wilaya .

**Article24.** - Le présent décret sera publié au *journal officiel* de la République Algérienne Démocratique et populaire .

Fait à Alger le 22 février 1995

Mokdad SIFI



# INSTITUT NATIONAL DE LA MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

## RECUEIL DE TEXTES REGLEMENTAIRES

JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE

### Arrêté interministériel du 17 juillet 1995 relatif aux mesures sanitaires applicables à la rage animale

**Le ministère de l'intérieur, des collectivités locales, de l'environnement et de la réforme administrative ;**

**Le ministère des finances,**

**Le ministre de la santé et de la population et**

**Le ministre de l'agriculture,**

Vu l'ordonnance n°66-156 du 8 juin 1966, modifiée et complétée, portant code pénal ;

Vu la loi n° 82-10 du 21 août 1982 relative à la chasse ;

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

Vu la loi n°88-08 du 26 janvier 1988 relative à la médecine vétérinaire et à la protection de la santé animale et notamment ses chapitres II, III du titre IV ;

Vu la loi n°90-09 du 7 avril 1990 relative à la commune ;

Vu le décret législatif n°93-01 du 19 janvier 1993 portant loi de finances pour 1993, notamment son article 137 ;

Vu le décret n°84-379 du 15 décembre 1984 fixant les statuts particuliers des médecins vétérinaires ;

Vu le décret n°84-380 du 15 décembre 1984 fixant les statuts particuliers des médecins vétérinaires spécialistes ;

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

Vu le décret présidentiel n°94-93 du 15 avril 1994 portant nomination des membres du Gouvernement, modifié et complété ;

Vu le décret exécutif n°93-148 du 22 juin 1993 portant réaménagement des statuts de l'institut national de la santé animale et changement de sa dénomination en institut national de la médecine vétérinaire ;

Vu le décret exécutif n°95-66 du 22 février 1995 fixant la liste des maladies animales à déclaration obligatoire et des mesures générales qui leur sont applicables ;

Vu l'arrêté interministériel du 1<sup>er</sup> septembre 1984 portant institution d'un comité national et des comités de wilaya de lutte contre les zoonoses ;

**Arrêtent :**

**TITRE I**

#### **DISPOSITIONS GENERALES**

**Article 1<sup>er</sup>.** - La rage dans toutes les espèces est une maladie contagieuse qui donne lieu à déclaration et à l'application de mesures sanitaires spécifiques, définies ci-dessous.

**Art.2.** - Lorsque le diagnostic de rage a été confirmé par un laboratoire agréé ou par un médecin vétérinaire, le wali peut immédiatement déclarer zone atteinte par la maladie tout territoire, défini selon les nécessités, dans lequel a été trouvé l'animal enragé.

L'arrêté du wali portant déclaration d'une zone atteinte par la rage est affichée dans toutes les assemblées populaires communales et lieux publics de la zone concernée.

En outre, et notamment lorsque l'extension de la maladie revêt un caractère envahissant, le ministre de l'agriculture procède ou fait procéder par les walis à toute mesure qu'il juge appropriée.

**Art.3.** - Toute personne qui a constaté chez un animal les symptômes caractéristiques de la rage dans sa forme furieuse doit, si elle en est le propriétaire ou si elle en a la garde ou la charge de soins, procéder ou faire procéder à son abattage sur place et sans délai, et en aviser le vétérinaire de la circonscription ou le président de l'assemblée populaire communale.

Tous les animaux abattus pour cause de rage doivent immédiatement être enfouis sur place.

Dès qu'il a eu connaissance d'un cas de rage, le président de l'assemblée populaire communale est tenu de s'assurer de l'exécution des opérations d'abattage et d'enfouissement.

Lorsqu'ils sont reconnus atteints de rage, les animaux vivants à l'état sauvage et les animaux abandonnés ou errants sont abattus, sans délai, soit par les agents de la force publique, soit par les agents chargés de la police, de la chasse ou toute personne titulaire d'un permis de chasse et requise par le président de l'assemblée populaire communale.

**Art.4.** - Est considéré comme animal contaminé :

- 1) - Tout animal ayant été en contact avec un animal chez qui le diagnostic de rage a été confirmé.
- 2) - Tout animal sensible à la maladie qui a été mordu ou griffé par un animal chez qui le diagnostic de rage a été confirmé.

Est considéré comme éventuellement contaminé, tout animal ayant été en contact, par morsure, griffure ou toute autre manière avec un animal suspect, ou d'origine inconnue.

Toute personne qui est propriétaire ou qui a la garde ou la charge des soins d'animaux domestiques contaminés est tenue d'en informer,

immédiatement, le vétérinaire de la circonscription ou le président de l'assemblée populaire communale.

Le président de l'assemblée populaire communale doit faire procéder sans, délai, à leur abattage à moins qu'il ne s'agit de chiens ou d'herbivores dont la conservation est reconnue possible dans les conditions fixées au titre II du présent arrêté.

En outre, il est sursis à l'abattage des animaux contaminés qui ont mordu ou griffé une personne; ces animaux sont placés sous surveillance vétérinaire au même titre que les animaux suspects et dans les conditions définies au titre V du présent arrêté.

**Art.5.** - Est considéré comme animal suspect :

- 1) - tout animal sensible à la rage qui a mordu ou griffé soit une personne, soit un animal domestique,
- 2) - tout animal sensible à la rage qui présente des symptômes non susceptibles d'être rattachés de façon certaine à une autre maladie.

Toute personne qui est propriétaire ou qui a la garde ou la charge des soins d'un animal suspect est tenu d'en informer le vétérinaire de la circonscription ou le président de l'assemblée populaire communale.

Conformément aux dispositions de l'article 73 de la loi n°88-08 du 26 janvier 1988 susvisé, les animaux suspects et ceux qu'ils auraient pu éventuellement contaminer sont placés sous la surveillance d'un médecin vétérinaire. Les présidents d'A.P.C peuvent en ordonner l'abattage dans le cas où ils présenteraient un danger pour les personnes ou lorsque les circonstances locales ne permettent pas la mise en œuvre effective et immédiate des mesures de surveillance prescrites.

La mise sous surveillance est levée lorsque la rage n'a pas été mise en évidence par le médecin vétérinaire. Dans le cas contraire, un arrêté de déclaration d'infection est pris dans les conditions prévues à l'article 2.

**Art.6.** - Si, au cours de la période de mise sous surveillance, l'animal suspect ou éventuellement contaminé est trouvé mort ou abattu, le cadavre ou la tête doivent être envoyés à un laboratoire agréé en vue du diagnostic.

Seul un médecin vétérinaire est habilité à effectuer le prélèvement en vue du diagnostic de rage, en prenant toutes les précautions nécessaires.

**Art.7.** - Sous réserve des dispositions de l'article 8, les animaux domestiques suspects et contaminés dont la conservation par leur propriétaire a été autorisée ne peuvent faire l'objet d'aucune transaction à titre gratuit ou onéreux. Ils ne peuvent être transportés hors des locaux, cours, enclos, herbages et pâturages, sans autorisation de l'inspecteur vétérinaire de wilaya sauf en vue de leur abattage, lorsque celui-ci est prescrit.

**Art.8.** - Les herbivores contaminés peuvent être abattus en vue de la consommation à condition que l'abattage de ces animaux soit pratiqué dans un délai compris entre quarante-huit (48) heures et huit (8) jours après la contamination et sous réserve de ne pas appartenir à un effectif dans lequel la rage a été mise en évidence depuis moins de six mois.

**Art.9.** - Dans les territoires couverts par un arrêté du wali déclarant la zone atteinte de rage, les chiens doivent être tenus en laisse et muselés et les chats doivent être enfermés.

Les chiens et les chats errants sont capturés et transportés en fourrière à la diligence du président d'A.P.C.

Les chats sont abattus immédiatement et les chiens après un délai de quarante-huit (48) heures au cours duquel ils peuvent être restitués à leur propriétaire, sur présentation d'un certificat de vaccination antirabique en cours de validité et identifiant exactement l'animal.

Les chiens et les chats errants dont la capture est impossible ou dangereuse sont abattus sur place.

**Art.10.** - Indépendamment des mesures prises à l'article 5 ci-dessus, la surveillance à laquelle sont soumis les animaux suspects ayant mordu ou griffé une personne ou un animal domestique est fixée à une durée de quinze (15) jours,

Cette durée peut être modifiée par arrêté du ministre de l'agriculture,

Les modalités d'application de cet article sont déterminées au titre V du présent arrêté.

## TITRE II

### DEROGATION A L'ABATTAGE DES ANIMAUX CONTAMINES DE RAGE

**Art.11.** - Pour bénéficier d'une dérogation à l'abattage d'un chien contaminé de rage, le propriétaire doit en faire la demande écrite à l'inspecteur vétérinaire de la wilaya où la contamination s'est produite.

Dans cette demande, le propriétaire indique qu'il accepte de prendre l'entière responsabilité des éventuelles conséquences résultant de la conservation de son animal.

**Art.12.** - A l'appui de sa demande, le propriétaire doit fournir un certificat de vaccination conforme au modèle fixé par le ministre de l'agriculture, portant identification du chien.

Pour être valable, cette vaccination doit, au jour de la contamination, avoir été effectuée :

- En cas de primovaccination depuis plus d'un mois et moins d'un an,
- En cas de vaccination de rappel, depuis moins d'un an.

**Art.13.** - Dans le cas où les conditions énumérées aux articles 11 et 12 du présent arrêté sont remplies, le chien contaminé de rage devra, pour être conservé, recevoir une injection de rappel de vaccin antirabique avant l'expiration d'un délai de cinq (5) jours maximum suivant la contamination.

Le certificat de vaccination antirabique de rappel, délivré par le vétérinaire vaccinateur, sera joint à la demande de dérogation à l'abattage de l'animal.

**Art.14.** - Tout chien contaminé de rage, bénéficiant de la dérogation à l'abattage, est placé sous la surveillance d'un médecin vétérinaire pendant une durée de trois (03) mois et sera soumis, aux frais du propriétaire, à la visite d'un vétérinaire à l'issue de chacun de ces mois de surveillance.

**Art.15.** - La surveillance est levée à l'issue du troisième mois si aucun symptôme de rage n'est constaté. Toutefois, le propriétaire doit s'engager, par écrit, à ne pas se dessaisir de l'animal avant l'expiration d'un nouveau délai de neuf (09) mois.

**Art.16.** - Pendant les trois (03) mois de mise sous surveillance, l'apparition d'un signe quelconque de maladie ou la mort quelle qu'en soit la cause, doivent entraîner sans délai, la présentation de l'animal ou de son cadavre au vétérinaire sous la surveillance duquel il est placée, sa disparition doit, de même, lui être signalée.

**Art.17.** - Pour bénéficier d'une dérogation à l'abattage des herbivores mordus ou griffés par un animal enragé, le propriétaire doit en faire la demande à l'inspecteur vétérinaire de la wilaya.

Dans cette demande, le propriétaire indique qu'il accepte l'entière responsabilité des éventuelles conséquences résultant de la conservation de ses animaux.

**Art.18.** - La dérogation à l'abattage des herbivores domestiques contaminés peut être accordée .

1) - aux animaux vaccinés qui répondent aux conditions fixées aux articles 12 et 13 du présent arrêté,

2) - aux animaux non vaccinés, lorsque leur abattage doit entraîner des pertes économiques importantes .

**Art.19.** - Les herbivores contaminés bénéficient de la dérogation à l'abattage sont soumis à la surveillance d'un médecin vétérinaire, pendant une durée de trois (03) mois .

Ils seront visités aux frais de leur propriétaire par le vétérinaire concerné à l'issue de chacun de ces mois de surveillance .

La mise sous surveillance est levée si aucun symptôme de rage n'est constaté .

Toutefois, le propriétaire s'engage à ne pas se dessaisir de l'animal avant l'expiration d'un nouveau délai de neuf (09) mois .

### TITRE III

#### LUTTE CONTRE LES ANIMAUX ERRANTS

**Art.20.** - Les présidents d'assemblées populaires communales peuvent prendre toutes dispositions propres à empêcher la divagation des chiens et des chats ,

Ils peuvent ordonner que les chiens et les chats soient tenus en laisse et que les chiens soient muselés .

Ils prescrivent que les chiens et les chats errants qui seraient trouvés sur la voie publique, dans les champs ou dans les bois, seront conduits à la fourrière et abattus si leur propriétaire reste inconnu ou s'ils n'ont pas été réclamés par lui ; l'abattage est réalisé dès l'expiration d'un délai de quatre jours après la capture. Dans le cas où les animaux sont identifiés par le port d'un collier sur lequel figurent le nom et l'adresse de leur maître, le délai d'abattage est porté à huit (08) jours .

**Art.21.** - Tout chien circulant sur la voie publique, en liberté ou même tenu en laisse, doit être muni d'un collier portant le nom et adresse de son propriétaire .

### TITRE IV

#### LA VACCINATION ANTIRABIQUE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

**Art.22.** - La vaccination antirabique des animaux de l'espèce canine et féline est obligatoire.

Elle peut être rendue obligatoire pour les autres espèces animales par arrêté du ministre de l'agriculture .

**Art.23.** - La vaccination antirabique ne peut être effectuée que par un médecin vétérinaire. Elle donne lieu à l'établissement d'un certificat de vaccination antirabique dont le modèle est fixé par le ministre de l'agriculture.

**Art.24.** - Seuls les vaccins agréés par le ministre de l'agriculture peuvent être utilisés .

**Art.25.** - Après toute vaccination antirabique de chien ou chat, le propriétaire est tenu de faire enregistrer le certificat délivré par le vétérinaire vaccinateur au niveau du bureau d'hygiène communal ou à défaut, au niveau des services compétents de l'assemblée populaire communale du lieu de résidence .

**Art.26.** - 1/ - L'entrée en Algérie de carnivores domestiques en provenance de pays considérés comme infectés est subordonnée à la présentation par le propriétaire, d'un certificat de bonne santé et d'un certificat de vaccination attestant que ceux-ci ont été vaccinés depuis plus d'un mois et moins d'un an pour une primo-vaccination ou depuis moins d'un an pour une vaccination de rappel.

Ces mesures peuvent être modifiées par arrêté du ministre de l'agriculture .

2/ - Lors qu'ils sont de provenance de pays considérés comme indemnes de rage depuis au moins deux (02) ans, il est tenu compte de la présentation d'un certificat attestant que les carnivores ne présentent aucun signe de rage et qu'ils proviennent d'un pays où aucun cas de rage n'a été constaté depuis au moins deux (02) ans .

### TITRE V

#### EXAMEN DES ANIMAUX MORDEURS

**Art.27.** - Lorsqu'un animal vacciné ou non contre la rage, a mordu ou griffé une personne, il est placé à la diligence et aux frais de son propriétaire sous surveillance d'un vétérinaire pendant une période

de quinze (15) jours à compter du jour où la personne a été mordue ou griffée .

Si le propriétaire est inconnu ou défaillant à la mise en demeure qui lui est faite, le président de l'assemblée populaire communal fait procéder d'office à cette surveillance dans la fourrière où il fait conduire l'animal .

Pendant la durée de cette surveillance, le propriétaire ou la personne ayant la garde de l'animal ne peut s'en dessaisir ni l'abattre sans autorisation des services vétérinaires .

**Art.28.** - L'animal placé sous surveillance vétérinaire est présenté trois (03) fois par son propriétaire ou son détenteur au même vétérinaire ou à son remplaçant .

La première visite est effectuée dans les heures qui suivent la morsure ou la griffure, la seconde visite sept (07) jours après la morsure ou la griffure, la troisième visite quinze (15) jours après la morsure ou la griffure.

En l'absence de symptômes entraînant la suspicion de rage, le vétérinaire consulté établit à l'issue de chacune de ces deux premières visites, un certificat provisoire attestant que l'animal ne présente, au moment de la visite, aucun signe suspect de rage .

A l'issue de la troisième visite, le quinzième (15) jour après que l'animal ait mordu ou griffé, le vétérinaire rédige un certificat attestant que l'animal mis en observation n'a présenté, à aucun moment de celle-ci, des symptômes rabiques .

**Art.29.** - La non présentation de l'animal dans les délais prescrits à l'article 27 ci-dessus doit être

immédiatement signalée à l'autorité investie des pouvoirs de police et l'inspecteur vétérinaire de wilaya par le vétérinaire sous la surveillance duquel il est placé ; sa disparition doit de même, lui être immédiatement signalée.

En présence de suspicion de rage, l'animal est maintenu en observation, isolé et mis à l'attache, sauf impossibilité qui justifierait son abattage immédiat .

**Art.30.** - Dans le cas où l'animal qui a mordu ou griffé une personne est un animal contaminé, celui-ci doit être mis en observation, isolé et maintenu à l'attache sauf impossibilité qui justifierait son abattage immédiat.

**Art.31.** - Le présent arrêté sera publié au *Journal Officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

*Fait à Alger, le 17 juillet 1995*

*Le ministre des finances*  
**Ahmed BENBITOUR**

*Le ministre de l'intérieur,*  
*des collectivités locales,*  
*de l'environnement,*  
*et de la réforme administrative*  
**Abderrahmane MEZIANE CHERIF**

*Le ministre de l'agriculture*  
**Noureddine BAHBOUH**

*Le ministre de la santé et de la population*  
**Yahia GUIDOUM**

[Retour au Sommaire](#)