

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2020

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

SAHRAOUI Siham & ACHIT Latifa

Thème

**Détermination de la DL50 du titre viral minimal pour la
fabrication d'un vaccin antirabique cellulaire inactivé**

Soutenu le: 22/10/2020

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mr. ARAB Amar

MCB

Univ. de Bouira

Président

Mr. KHADIR Mouloud

Maitre chargé de Recherche

Institut Pasteur

Promoteur

Mme. BENSMAIL Souhila

MAA

Univ. de Bouira

Co-Promotrice

Mr. LAMINE Salim

MCA

Univ. de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2019/2020



Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à la contribution de plusieurs personnes à qui on voudrait témoigner toute nos gratitudes.

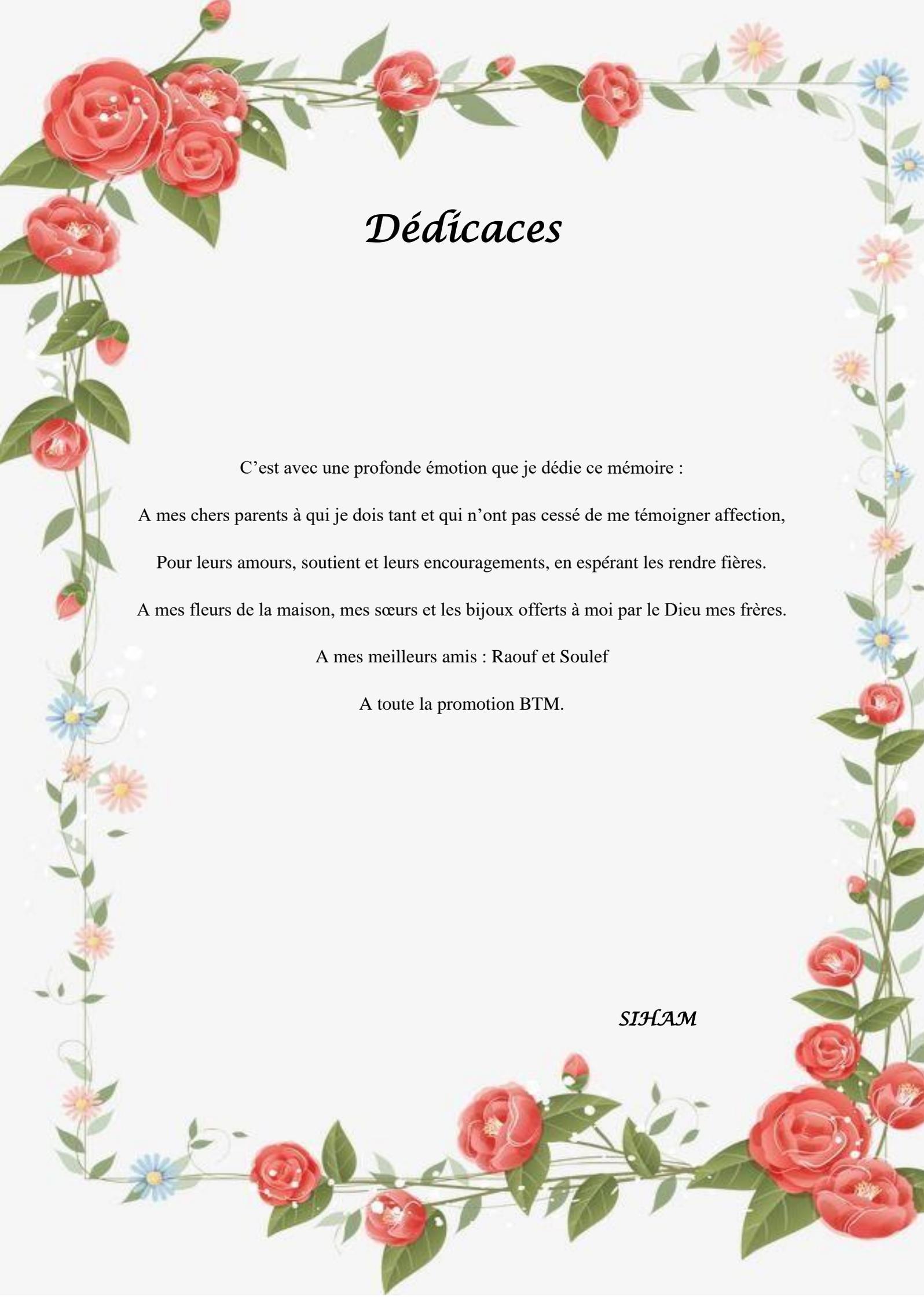
Nous voudrions tout d'abord adresser nos reconnaissances, nos sincères remerciements et notre profond respect à notre directeur de mémoire, Mr. Khadir Mouloud, maître de recherche à l'institut Pasteur d'Alger (IPA), au Dr. Issad M. et à notre Co-promotrice, Mme Bensmail S., maître assistant A à l'Université AKLI MOUHAND OULHADJ de Bouïra, pour leur patience, leur disponibilité et surtout leurs judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter nos réflexions. Nous les remercions infiniment de nous avoir encadrées, orientées, aidées et conseillées.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à Mr Arab Amar, maître de conférences B à l'Université AKLI MOUHAND OULHADJ de Bouïra, qui a accepté de présider le jury de soutenance.

A Mr Lamine Salim, maître de conférences A à l'Université AKLI MOUHAND OULHADJ de Bouïra, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail.

Enfin, nous présentons nos sincères remerciements, notre profond respect et notre gratitude à toute personne intervenant de près ou de loin dans la réalisation de ce modeste travail.

ACHIT Latifa & SAHRAOUI Sihem.



Dédicaces

C'est avec une profonde émotion que je dédie ce mémoire :

A mes chers parents à qui je dois tant et qui n'ont pas cessé de me témoigner affection,

Pour leurs amours, soutient et leurs encouragements, en espérant les rendre fières.

A mes fleurs de la maison, mes sœurs et les bijoux offerts à moi par le Dieu mes frères.

A mes meilleurs amis : Raouf et Soulef

A toute la promotion BTM.

SIHAM



Dédicaces

A mon très cher Papa.

Mr. ACHIT Elhadí

Pour l'affection dont tu m'as toujours comblé et les sacrifices infinis que tu n'as cessé de consentir, avec abnégation, pour mon éducation. J'espère que tu trouveras dans ce modeste travail, l'expression de mon amour et mon respect les plus sincères et une infime partie de ma reconnaissance éternelle. Qu'ALLAH le plus Puissant, t'accorde une longue vie pleine de bonheur, de santé et de paix.

A ma très chère Maman.

Ce travail est le fruit de tes efforts, de ton amour, de tes prières et de tes encouragements. Tu as consacré le meilleur de toi même à notre éducation et à notre réussite. Puisse le Grand DIEU me permettra de te le rendre au centuple. Tes peines, tes privations, tes sacrifices n'ont pas de mesure à mes yeux. C'est immense comme si je m'arrêtais devant la mer, le regard cherchant une limite invisible...mon DIEU, les mots me manquent, Je t'aime maman.

LATIFA



Dédicaces

A mes frères

Vous avez toujours été près de moi, vous m'avez toujours offert beaucoup de tendresse épaulée pendant mon parcours étudiant. Merci Frères, d'avoir montré tant de complaisance et de serviabilité à mon égard. Puisse Allah, le Très Haut, vous accorder une vie heureuse et un avenir prospère.

A MES CHÈRES AMIS

Je ne peux pas trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées. Vous êtes pour moi des amis sur qui je peux compter. En témoignage de la forte amitié qui nous unit, de l'attachement, des souvenirs de ces années pendant lesquelles nous avons partagé joies et difficultés, des préparations passées ensemble et de nos disputes par je vous dédie, chers amis, ce travail signe de l'affection que j'ai pour vous avec tous mes meilleurs vœux de bonheur.

A ma tante et son mari, pour leurs chaleureux encouragements et hospitalités.

A une personne très chère à mon cœur RACHID, je voudrais exprimer ma reconnaissance pour ton aide, pour tes conseils, merci d'avoir fait preuve d'une grande source d'encouragement et de soutien.

Sans oublier mon âme sœur RABIAA pour son soutien moral, son aide et sa compréhension tout au long de mon parcours. En reconnaissance de votre soutien, votre aide et encouragements. Que ce travail soit un témoignage de mon amour de ma gratitude et de mon respect.

Latifa

Résumé

La rage est une maladie zoonotique mortelle qui touche le système nerveux centrale. Elle est transmissible de l'animale enragé à l'homme par morsure. C'est une maladie à prévention vaccinale dont le contrôle de l'efficacité des vaccins antirabiques par des tests adéquats est devenu obligatoire selon les exigences de l'OMS et des autres organismes de réglementation. Dans cette étude, nous visons à mettre en évidence le seuil minimal du titre viral pour la fabrication d'un vaccin inactivé à usage vétérinaire efficace, ainsi d'expliquer la relation entre la dose initiale et le pouvoir protecteur du vaccin à tester.

Pour atteindre nos objectifs, quatre tests sont effectués : test de virulence sur le virus EBS5 et les trois vaccins préparés en culture cellulaire (A, B et C) afin de déterminer la DL_{50} , test de virulence résiduelle après l'inactivation chimique par la BPL pour le but d'apprécier l'inactivation total du virus rabique, le test de stérilité pour détecter une éventuelle contamination et le test d'activité des NIH qui est réalisé pour les différentes dilutions de ce vaccin dans le cadre d'obtenir la DE_{50} et le pouvoir protecteur de chaque vaccin préparé.

Les résultats obtenus indiquent que le test d'activité des NIH permis d'une part d'évaluer l'activité réelle du type de vaccin inactivé et d'autre part de démontrer l'existence d'une corrélation positive entre la dose initiale et le pouvoir protecteur du vaccin. A travers l'analyse des données obtenues sur l'activité des vaccins EBS5 (A, B et C), nous pouvons conclure que les vaccins A et C sont efficaces selon leurs valeurs antigéniques ($VA= 1,28$, $VC=2,02$) et capables d'induire une réponse immunitaire protectrice contre le virus CVS (protègent les souris vaccinées contre la maladie). Alors que pour le vaccin B, il est préférable de refaire le test afin de confirmer la logique des résultats obtenus. Cependant, le seuil minimal du titre viral qui entraîne une réponse immunitaire protectrice contre le virus rabique n'a pas été déterminé.

Mots clés: Rage, pouvoir protecteur, vaccin antirabique inactivé, test d'activité des NIH, titre viral.

Abstract

Rabies is a fatal zoonotic disease that affects the central nervous system. It is transmissible from rabid animals to humans by bite. It is a vaccine-preventable disease whose monitoring the efficacy of rabies vaccines by adequate tests has become mandatory according to the requirements of WHO and other regulatory organizations. In this study, we aim to demonstrate the minimum viral titre threshold for the manufacture of an effective inactivated vaccine for veterinary use, thus to explain the relationship between the initial dose and the protective power of the vaccine to be tested.

To achieve our objectives, four tests are carried out: virulence test on the EBS5 virus and the three vaccines prepared in cell culture (A, B and C) to determine the LD₅₀, residual virulence test after chemical inactivation by BPL for the purpose of assessing the total inactivation of the rabies virus, the sterility test to detect possible contamination and the NIH activity test which is carried out for the different dilutions of this vaccine in the context of obtaining the ED₅₀ and the protective power of each vaccine prepared.

The results obtained indicate that the NIH activity test made it possible, on the one hand, to assess the real activity of the inactivated vaccine type and, on the other hand, to demonstrate the existence of a positive correlation between the initial dose and the protective power of the vaccine. Through the analysis of the data obtained on the activity of the EBS5 vaccines (A, B and C), we can conclude that the vaccines A and C are effective according to their antigenic values (VA = 1.28, VC = 2.02) and able to induce a protective immune response against the CVS virus (protect vaccinated mice against the disease). While for vaccine B, it is better to repeat the test in order to confirm the logic of the obtained results. However, the minimum viral titer threshold that elicits a protective immune response against rabies virus has not been determined.

Keywords: Rabies, protective potency, inactivated rabies vaccine, NIH potency test, viral titer.

ملخص

داء الكلب هو مرض حيواني المنشأ قاتل يصيب الجهاز العصبي المركزي. ينتقل من الحيوانات المسعورة إلى الإنسان عن طريق العض. إنه مرض يمكن الوقاية منه باللقاح، حيث أصبح رصد فعالية لقاح داء الكلب من خلال الاختبارات المناسبة إلزاميًا وفقًا لمتطلبات منظمة الصحة العالمية والهيئات التنظيمية الأخرى. في هذه الدراسة، نهدف إلى توضيح الحد الأدنى من عتبة العيار الفيروسي لتصنيع لقاح فعال معطل للاستخدام البيطري، وبالتالي شرح العلاقة بين الجرعة الأولية والقوة الوقائية للقاح المراد اختباره.

لتحقيق أهدافنا، تم إجراء أربعة اختبارات: اختبار الفوعة على فيروس EBS5 واللقاحات الثلاثة المحضرة في مزرعة الخلايا (A و B و C) لتحديد LD50، اختبار الفوعة المتبقية بعد التنشيط الكيميائي بواسطة BPL لغرض تقييم التعطيل الكلي لفيروس داء الكلب، اختبار العقم لاكتشاف التلوث المحتمل واختبار نشاط المعاهد الوطنية للصحة الذي يتم إجراؤه للتخفيفات المختلفة لهذا اللقاح في سياق الحصول على ED50 ويتم تحضير القوة الوقائية لكل لقاح.

تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن اختبار نشاط المعاهد الوطنية للصحة جعل من الممكن من ناحية تقييم النشاط الحقيقي لنوع اللقاح المعطل ومن ناحية أخرى إثبات وجود ارتباط إيجابي بين الجرعة الأولية والقوة الوقائية للقاح. من خلال تحليل البيانات التي تم الحصول عليها حول نشاط لقاحات EBS5, A, B, و C، يمكننا أن نستنتج أن اللقاحين A و C فعالان وفقًا لقيمتيهم المستضدية ($VA = 1.28$ ، $VC = 2.02$) وقادرة على إحداث استجابة مناعية وقائية ضد فيروس CVS (حماية الفئران الملقحة ضد المرض). بينما بالنسبة للقاح B، من الأفضل تكرار الاختبار لتأكيد منطق النتائج التي تم الحصول عليها. ومع ذلك، لم يتم تحديد عتبة العيار الفيروسي الدنيا التي تثير استجابة مناعية وقائية ضد فيروس داء الكلب.

الكلمات المفتاحية: داء الكلب، الفاعلية الوقائية، لقاح داء الكلب المعطل، اختبار فاعلية المعاهد الوطنية للصحة، العيار الفيروسي.

Table des Matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Glossaire	
Introduction.....	1
Chapitre I : Etude bibliographique.....	3
I. Généralités sur la rage.....	3
I.1. Définition	3
I.2. Historique.....	3
I.3. Répartition géographique de la rage	3
I.4. Les espèces réservoirs, évolution et adaptation.....	4
I.5. Etiologie et Classification.....	4
I.5.1. Structure de virus.....	6
I.5.2. Propriétés physico-chimiques de virus rabique.....	7
I.6. Pathogénie de l'infection rabique.....	7
I.6.1. Mode de transmission.....	7
I.6.2. Mode d'action.....	8
I.7. Diagnostic de la rage.....	9
I.7.1. Chez l'homme.....	9
I.7.2. Chez l'animal.....	9
I.8. Traitement.....	10
I.8.1. Le traitement local.....	10
I.8.2. Traitement général.....	10
I.9. Prévention.....	11
I.9.1. Prévention de la rage chez l'homme.....	11
I.9.2. Prévention de la rage animale.....	11
II. La vaccination antirabique.....	11
II.1. Historique de vaccination.....	11
II.2. Définition de la vaccination.....	12
II.3. Définition du vaccin.....	12
II.4. Les différentes souches vaccinales.....	12
II.5. Types des vaccins.....	13

Table des matières

II.5.1. Les vaccins à virus vivant (atténués).....	13
II.5.2. Les vaccins à virus tués (inactivés).....	13
II.5.2.1. Les vaccins dont le virus est répliqué <i>in vivo</i>	13
II.5.2.2. Les vaccins dont le virus est répliqué <i>in vitro</i>	14
II.5.2.3. Caractéristique des vaccins à virus inactivés.....	14
Chapitre II: Matériel et Méthodes.....	15
I. Matériel.....	15
I.1. Matériel biologique.....	15
I.1.1. Souriceaux.....	15
I.1.2. Souris.....	15
I.1.2.1. Elevage des souris.....	15
I.1.2.2. Matériel permettant la mise en place d'un élevage des souris.....	15
I.1.2.3. Reproduction.....	16
I.1.2.4. Hygiène au sein de l'animalerie.....	17
I.1.3. Virus vaccinal.....	18
I.1.4. Souche virale.....	18
I.1.5. Vaccins.....	18
I.1.6. Milieux de culture.....	18
I.1.7. Tampon de dilution.....	18
I.2. Matériel de manipulation.....	18
II. Méthodes.....	19
II.1. Préparation de tampon lactose.....	19
II.2. Préparation des vaccins.....	21
II.3. L'inactivation des vaccins (A, B et C) par BPL.....	21
II.4. Répartition du vaccin rabique	21
II.5. Contrôle d'efficacité des vaccins.....	22
II.5.1. Test de stérilité (<i>in vitro</i>).....	22
II.5.2. Test de virulence initial (<i>in vivo</i>).....	22
II.5.2.1. Préparation de l'inoculum.....	22
II.5.2.2. Inoculation des souriceaux.....	24
II.5.2.3. Lecture de fiche du contrôle de virulence initial.....	25
II.5.2.4. Détermination du titre viral.....	25
II.5.3. Test de virulence résiduelle (<i>in vivo</i>).....	25
II.5.4. Le test d'activité des <i>National Institutes of Health</i> (NIH).....	25

Table des matières

II.5.4.1. Préparation de l'inoculum.....	25
II.5.4.2. Inoculation des souris.....	27
II.5.4.3. Test d'épreuve sur souris (challenge).....	27
II.5.4.3.1. Préparation de la souche de provocation CVS.....	27
II.5.4.3.2. Inoculation des souris.....	28
II.5.4.4. Lecture de fiche du test d'activité des NIH.....	29
II.5.4.4.1. Calcul de DE_{50} et la valeur antigénique.....	29
II.5.4.4.2. Détermination de la DL_{50} du virus d'épreuve CVS.....	29
Chapitre III : Résultats et discussion	30
I. Résultats	30
I. 1. Détermination du titre viral des différentes dilutions du vaccin antirabique vivant.	30
I.2. Test de virulence résiduelle après l'inactivation par la BPL.....	30
I.3. Mise en évidence de pouvoir protecteur du vaccin A, B et C (inactivés) et le vaccin de référence.....	31
I.3.1. Taux de protection induit par les vaccins A, B, C et le vaccin de référence.....	31
I.4. Analyse comparative de l'efficacité des vaccins testés	33
II. Discussion.....	34
II.1. Les différentes doses initiales du vaccin EBS5	34
II.2. Test d'activité des NIH pour les vaccins EBS5 (A, B et C)	34
II.3. Degré de protection conféré par les vaccins EBS5.....	35
II.4. Etude comparative entre la dose initiale et le pouvoir protecteur des vaccins A, B et C	35
II.5. La dose minimale protectrice du vaccin EBS5.....	35
Conclusion et perspectives.....	37
Références bibliographiques.....	38
Annexes	

Liste des abréviations

ARN : Acide ribonucléique
BCG : Bacille de Calmette et Guérin
BPL : Béta-propiolactone
CVS : *Challenge Virus Standard*
DE₅₀ : Dose Efficace pour 50% des animaux
DL₅₀ : Dose Létale pour 50% des animaux
ERA: *Evelyn-Rokitnicki-Abelseth*
HEP: *High Egg Passage*
I/C : intracérébrale
I/P : intra-péritonéale
IPA : Institut Pasteur d'Algérie
LCR : Liquide Céphalo-rachidien
LEP : *Low Egg Passage*
OEI : Organisation Internationale des Epizooties
NIH : *National Institutes of Health*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
RT-PCR : Reverse transcriptase-PCR
SAD: *Street Alabama Dufferin*

Liste des Figures

Figure 1 :	Illustration géographique de risque de la rage dans le monde.....	04
Figure 2 :	Vue du virus rabique sous microscope électronique	06
Figure 3 :	Schéma de la structure du virus rabique	07
Figure 4 :	Physiopathologie de la rage.....	09
Figure 5 :	Méthodes de diagnostic de la rage	10
Figure 6 :	Cage rectangulaire d'élevage	15
Figure 7 :	Aliment pour souris et biberon pour eau d'abreuvement (un par cage).....	16
Figure 8 :	Aspect de la litière utilisée.....	16
Figure 9 :	Une femelle avec ces souriceaux.....	17
Figure 10 :	Tampon lactose avant filtration stérilisante.....	20
Figure 11 :	Filtration stérilisante sous hotte.....	20
Figure 12 :	Tampon lactose préparé.....	20
Figure 13 :	Répartition des vaccins sous l'hotte à flux laminaire.	22
Figure 14 :	Schéma explicatif des dilutions de la suspension virale ERA en vue du titrage initial.....	23
Figure 15:	Schéma explicatif des dilutions du vaccin A avant BPL.....	24
Figure 16 :	Inoculation de la suspension virale par voie intracérébrale.....	24
Figure 17:	Préparation de série de dilution de facteur 5 pour le vaccin A.....	26
Figure 18 :	Inoculation par voie intra-péritonéale des souris par les vaccins.....	27
Figure 19 :	Schéma explicatif de la préparation des dilutions du virus CVS.....	28
Figure 20 :	Inoculation par voie intracérébrale des souris par les vaccins.....	29
Figure 21 :	Variation de la dose efficace 50 en fonction des vaccins A, B, C.....	33
Figure 22:	Variation des valeurs antigéniques en fonction des vaccins EBS5 testés.....	33

Liste des Tableaux

Tableau 01 :	Les différentes espèces de <i>Lyssavirus</i> et leur répartition géographique.....	05
Tableau 02 :	Matériel utilisé durant la manipulation.....	19
Tableau 03 :	Les titres viraux des différents vaccins.....	30
Tableau 04 :	Les observations obtenues après le test de virulence résiduelle.....	31
Tableau 05 :	Les doses efficaces 50 et les valeurs antigéniques des vaccins A, B, C et la dose létale 50 du virus CVS.....	31
Tableau 06 :	Taux de survie des souris en fonction des dilutions des vaccins A, B, C et le vaccin de référence.....	32
Tableau 07 :	Pourcentage des différents vaccins A, B et C.....	34

Glossaire

BSR : c'est la lignée cellulaire qui a servie à la multiplication du virus ERA : le virus utilisé dans la préparation du vaccin

DL₅₀: est la quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50% (la moitié) d'un groupe d'animaux d'essai.

DE₅₀: est un indicateur quantitatif de la puissance d'un médicament. Cet indicateur mesure la dose de substance provoquant une réponse thérapeutique chez 50% de la population ayant reçu le traitement.

Encéphalite : inflammation plus ou moins étendue de l'encéphale qui se manifeste par des symptômes multiples (troubles de la conscience, paralysies, crises convulsives, etc.) d'origine infectieuse, toxique ou dégénérative.

Intra-vitam : est la méthode à privilégier pour confirmer un cas de la rage humaine suspect alors que le sujet est encore vivant.

Post-mortem: est un examen médical des cadavres (autopsie).

RT-PCR: est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN.

VET-ERA : vaccin vivant atténué à usage vétérinaire une fois cultivé sur cellules BSR ,ce virus est nommé EBS5 (nom donné par le préparateur pour le différencier du virus ERA

Zoonose : maladie infectieuse atteignant les animaux et qui peut être transmise à l'homme (Peste, rage).

Introduction

La rage est une maladie mythique qui avait conservée dans le public son auréole de terreur, dès lors que la phase clinique est déclarée (**Aubry et Rotivel, 2001**). Cette pathologie zoonotique évoque une inflammation du système nerveux central, laquelle sont sensibles tous les mammifères à sang chaud et dont l'agent causal est le virus rabique du genre *Lyssavirus* de la famille des *Rhabdoviridae*. Ce virus présente un tropisme important pour les cellules nerveuses et provoquant 59000 décès annuels (**Mangué, 2009 ; OMS, 2017**), le plus souvent suite à une infection transmise par le chien enragé (**Cynthia et al., 2008**).

La charge pour la santé publique pèse en grande partie sur l'Asie et l'Afrique avec 31000 et 24000 décès par an respectivement (**OMS, 2013**). Bien que la vaccination contre la rage de Louis Pasteur date de plus d'un siècle (1885), elle reste toujours une maladie invaincue (**Aubry et Rotivel, 2001**).

La vaccination des animaux reste la stratégie la plus efficace qui permet de réduire le nombre les vecteurs de transmission afin de réduire le nombre de décès imputable à la rage (**OMS, 2018**).

L'évaluation de l'activité des vaccins antirabiques est d'une importance primordiale afin de mesurer le pouvoir protecteur de ces derniers (**Abebe, 2006**). En effet, pour les vaccins inactivés, l'efficacité est contrôlée par le test d'activité des *National Institutes of Health* (NIH) qui consiste à comparer la dose efficace 50 (DE₅₀) du vaccin à contrôler à celle d'un vaccin de référence exprimée en Unité Internationale (UI). Quant aux vaccins vivants, leur évaluation consiste à déterminer le titre du virus par inoculation directe à 10 cobayes (**Blancou, 1985 ; Kaplan and Kaprowski, 1974**).

L'impact financier pèse très lourdement sur le budget de la santé publique pour faire face aux dépenses relatives à la production ou l'acquisition des vaccins utilisés à titres thérapeutiques. Le coût du vaccin est estimé en grande partie du coût final du principe actif du vaccin (le virus vaccinal).

L'objectif de cette étude est d'essayer d'utiliser un volume minimal du principe actif lors de la formulation du vaccin tout en assurant un pouvoir protecteur sans recours à l'utilisation de l'adjuvant pour l'augmentation de l'immunogénicité du vaccin. Ce dernier va avoir l'évaluation de son pouvoir protecteur par le test des activités des NIH appliqué sur un modèle animal (souris), qui est recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation Internationale des Epizooties (OIE) uniquement pour les vaccins inactivés.

Dans ce contexte, nous allons mettre en évidence l'efficacité réelle du vaccin inactif qu'on a produit et comparer entre les différentes doses du vaccin et leurs différentes dilutions par rapport à leur pouvoir protecteur. Ce travail est réalisé au niveau du service des vaccins viraux antirabiques de l'Institut Pasteur d'Algérie (Annexe d'Alger).

Pour atteindre nos objectifs, nous avons adoptés la démarche suivante :

- Préparation du vaccin antirabique vivant à différentes doses.
- Test de stérilité.
- Evaluation du titre viral (DL_{50}).
- Inactivation chimique du vaccin préparé.
- Test de la virulence résiduelle.
- Test d'activité des NIH.

I. Généralités sur la rage

I.1. Définition

La rage est une zoonose virale due à un *Lyssavirus* auquel sont sensibles tous les mammifères. Elle est transmissible accidentellement à l'homme, généralement à la suite d'une morsure, d'une griffure ou d'un léchage sur plaie par un animal enragé (**Dacheux et Bourhy, 2011**). Elle touche le système nerveux central des animaux à sang chaud et de l'être humain. Le virus rabique est neurotrope et la maladie se caractérise donc par une encéphalite aiguë inéluctablement mortelle une fois les signes cliniques sont déclarés (**Angot, 2004 ; Fernández, 2012**).

I.2. Historique

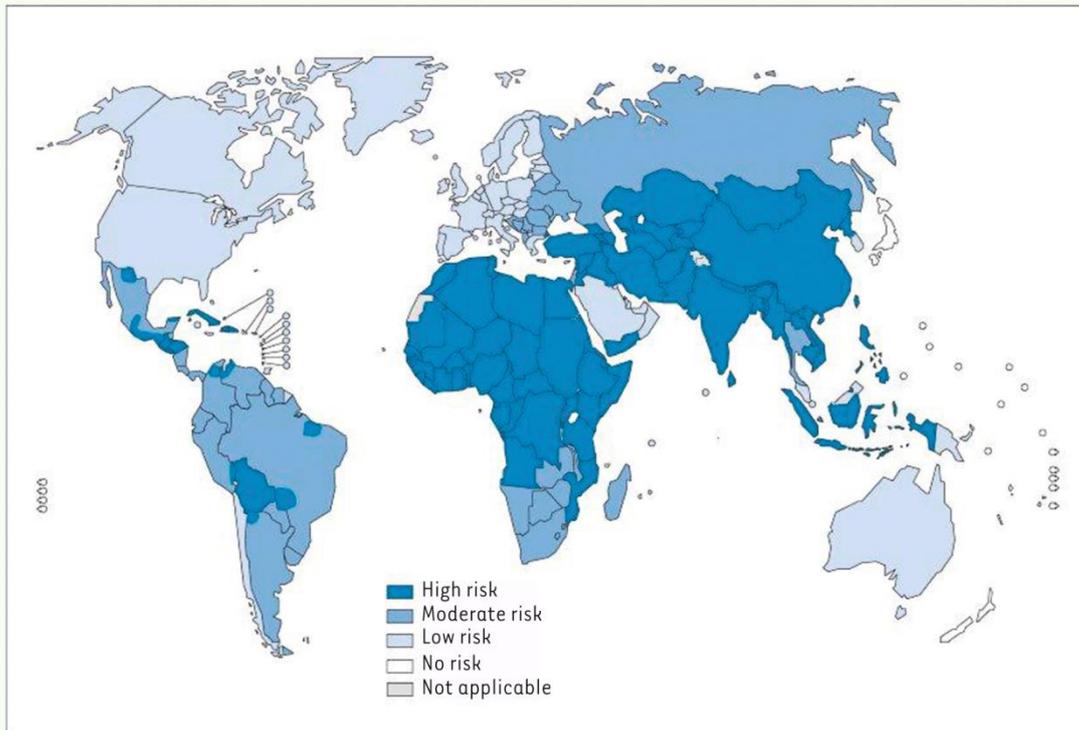
La maladie est connue depuis la plus haute antiquité mais ce n'est qu'en 1880 que les travaux de Louis Pasteur ont montré que cette pathologie était due à un virus. En 1879, Galtier (Professeur à l'Ecole vétérinaire de Lyon), transmet la maladie au lapin par injection de salive du chien enragé et immunise des moutons par injection intraveineuse de virus rabique (**Toma, 2006**).

En 1881, Louis Pasteur et son équipe montrent que le site principal de réplication du virus rabique est le système nerveux central et qu'il est plus facile de transmettre la rage par inoculation intracérébrale de substances virulentes. Ils ont réalisé des passages en série du virus par inoculation intracérébrale sur le lapin pour obtenir une souche virale fixe qui après atténuation par dessiccation sera utilisée en 1884 dans la mise au point d'un protocole d'immunisation sur des chiens.

En 1885, Pasteur appliqua pour la première fois, sur Joseph Meister (un enfant de 9 ans), le premier traitement antirabique en post exposition : l'enfant avait été sévèrement mordu par un chien (**Collard, 2006**).

I.3. Répartition géographique de la rage

Chaque année, des milliers de décès dus à la rage sont notifiés dans le monde, la plupart en Asie du Sud-Est, notamment péninsule indienne. Mais il existe une très probable sous notification, notamment en Afrique du Nord et Afrique noire où les zones périurbaines ne sont pas épargnées. Ainsi, en Tanzanie, les décès sont estimés à 100 cas (**Figure 1**) (**Imbert et al., 2008**).



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2010. All rights reserved

Data Source : World Health Organization
Map Production : Control of neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figure 1: Illustration géographique de risque de la rage dans le monde (OMS, 2010).

I.4. Les espèces réservoirs, évolution et adaptation

On distingue plusieurs types de la rage selon les espèces réservoirs :

- La rage domestique, dont le réservoir est le chien (rage canine). Elle est responsable de 99% des cas humains répartis entre l’Afrique (44%) et l’Asie (56%).
- La rage selvatique, liée aux animaux sauvages, implique des réservoirs variables selon les zones géographiques. Elle est imputable à l’espèce RABV (*Rabies virus*), l’une des 12 espèces de *Lyssavirus* identifiées et classifiées à ce jour.
- La rage des chiroptères (chauves-souris) qui est due à différentes espèces de *Lyssavirus* suivant la localisation géographique ; en particulier des espèces *European bat lyssavirus* type 1 (EBLV-1) et type 2 (EBLV-2) en Europe et des variantes de l’espèce RABV en Amérique (**Ribadeau-Dumas et al., 2013**).

I.5. Etiologie et classification

Il existe 12 espèces de *Lyssavirus* identifiées et classifiées à ce jour (**Tableau 1**).

Tableau 1: Les différentes espèces de *Lyssavirus* et leur répartition géographique (Ribadeau-Dumas *et al.*, 2013).

Espèces	Abréviation (ancienne classification)	Origine géographique	Vecteurs connus	Autres hôtes sensibles	Cas humains
Virus de la rage	RABV (génotype 1)	Mondiale	Carnivores au niveau mondial et chauves-souris en Amérique	Nombreux mammifères (l'homme)	55 000/an, 99% liés au chien
Virus <i>Duvenhage</i>	DUVV (génotype 4)	Afrique du sud, Kenya, Zimbabwe	Chauves-souris insectivores	Homme	3
<i>Lyssavirus</i> des chauves-souris européennes type 1	EBLV-1 (génotype 5)	Europe	Chauves-souris insectivores (<i>Eptesicus serotinus</i>)	Homme (Ukraine et Russie), mouton (Danemark), fouine (Allemagne) et chat (France)	1 confirmé 2 suspects
<i>Lyssavirus</i> des chauves-souris australiennes	EBLV-2 (génotype 6)	Australie	Chauve-souris insectivore (<i>Myotis sp</i>)	Homme (Royaume-Uni et Finlande)	-
Virus Lagos bat	LBV (génotype2)	Afrique subsaharienne	Chauve-souris frugivores (<i>Megachiroptera</i>)	Chien, chat, mangouste aquatique et chauve-souris insectivore	-
Virus Mokola	MOKV (génotype3)	Afrique subsaharienne	Inconnu	Musaraigne, chien, chat, rongeurs et homme	1 confirmé 1 suspect
Virus Aravan	ARAV	Asie centrale	Chauves-souris insectivores (<i>Myotis bluthi</i>)	-	Jamais décrit
Virus khujand	KHUV	Asie centrale	Chauves-souris insectivores (<i>Myotis mystacinus</i>)	-	Jamais décrit
Virus Irkut	IRKV	Sibérie de l'Est	Chauves-souris insectivore (<i>Murina leucogaster</i>)	-	Jamais décrit
Virus West caucasian bat	WCBV	Caucase	Chauves-souris insectivores (<i>Miniopterus scheibersi</i>)	-	Jamais décrit
Virus Ozernoe	-	Russie orientale	Chauve-souris (?)	Homme	1 (en 2007)

Virus Shimoni bat	SHIBV	Kenya	Chauve-souris (<i>Hipposideros commersoni</i>)	-	Jamais décrit
<i>Lyssavirus</i> Bokeloh bat	BBLV	Allemagne France	Chauve-souris (<i>Myotis nattereri</i>)	-	Jamais décrit
Virus Ikoma	IKOV	Afrique (Sérengeti)	Civette	-	Jamais décrit

I.5.1. Structure de virus

Le virus rabique est un virus enveloppé qui présente une forme d'obus sous microscopie électronique (**Figure 2**). La taille des virions est d'environ 100-300 nm de long sur 75 nm de diamètre (**Delmas et al, 2008**). Deux parties sont essentielles : la nucléocapside (nucléoprotéine) et l'enveloppe virale (glucido-lipido-protéine) (**Ribadeau-Dumas et al, 2013**). Cette dernière comporte deux protéines d'origine virale, la glycoprotéine G en position transmembranaire et la protéine de matrice M sous forme d'un manchon entre l'enveloppe et la nucléocapside virale.

L'information génétique est stockée dans un simple brin linéaire, monocaténaire, non segmenté, non poly-adenylé et de polarité négative. Cet ARN, d'environ 12000 nucléotides, est associé à trois protéines virales : la nucléoprotéine N, l'ARN polymérase ARN dépendante L et la phosphoprotéine P. La transcription de 3'en 5'aboutit à la production séquentielle de 5 ARN messagers (ARNm) en quantité décroissante, monocistroniques coiffés et polyadénylés, codant pour cinq protéines : la nucléoprotéine N ; la protéine de matrice M ; la phosphoprotéine P, la glycoprotéine G et l'ARN polymérase l'ARN dépendante L (**Dacheux et Bourhy, 2011 ; Ribadeau, 2013**). La protéine N est étroitement liée à l'ARN sur la totalité de sa longueur. Les protéines P et L ont un rôle fonctionnel important dans les phénomènes de transcription et de réplication du génome viral (**Figure 3**) (**Dacheux et Bourhy, 2011**).

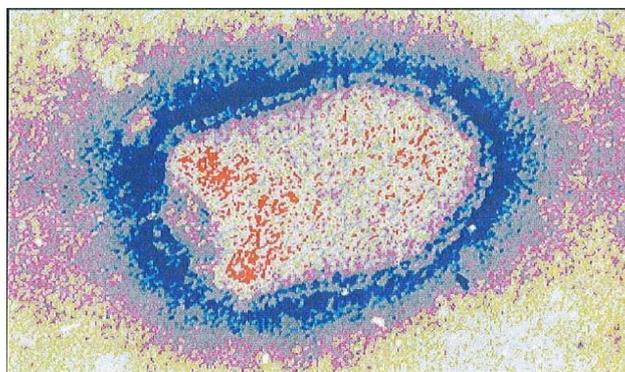


Figure 2: Vue du virus rabique sous microscope électronique (**Del Valle, 2000**).

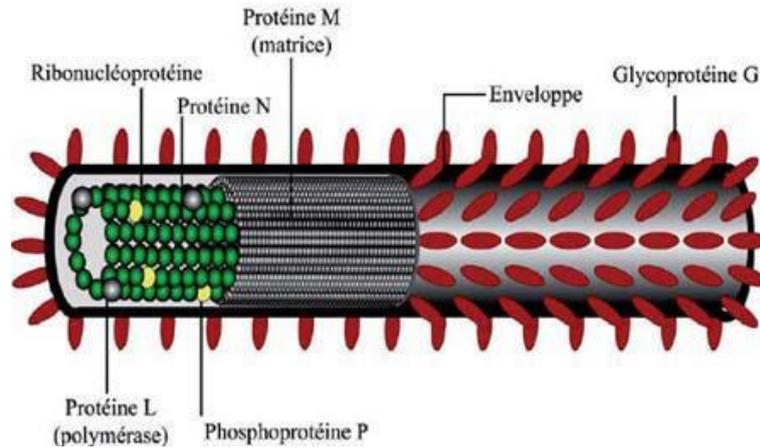


Figure 3: Schéma de la structure du virus rabique (Dacheux et Bourhy, 2011).

I.5.2. Propriétés physico-chimiques du virus rabique

Le virus de la rage est sensible à de nombreux agents physiques tels que la chaleur, la dessiccation lente, la lumière et les ultraviolets. Il est très sensible aux agents chimiques en particulier aux solvants organiques tels que le chloroforme et l'éther en raison de la nature lipidique de son enveloppe. Cette sensibilité est également retrouvée face aux solutions savonneuses, la plupart des antiseptiques et des désinfectants.

Ce virus est assez fragile et par conséquent, il ne persiste pas dans l'environnement. Il supporte mal les pH extrêmes (soit ceux inférieurs à 3 ou supérieurs à 11) et résiste en revanche dans une solution glycinée à 50%. Il se conserve plusieurs jours à +4°C et plusieurs années à -70°C ou sous forme lyophilisée à +4°C (Del Valle, 2000).

I.6. Pathogénie de l'infection rabique

I.6.1. Mode de transmission

La rage se transmet par morsure directe (et non par une morsure qui ne transperce pas les vêtements) ou par griffure d'un animal infecté. Elle peut être aussi transmise par contact direct des muqueuses ou des lésions cutanées récentes de la victime avec une matière infectieuse, habituellement la salive. Cette maladie peut être contractée par inhalation d'un aérosol contenant le virus ou par transplantation d'un organe infecté. L'ingestion de viande crue ou d'autres tissus provenant d'animaux infectés n'est pas une source connue d'infection humaine (Hemachudha *et al.*, 2005 ; Jackson, 2007).

I.6.2. Mode d'action

Après inoculation du virus rabique, le plus souvent au niveau de la peau ou des muqueuses, l'animal meurt dans les 15 jours qui suivent la déclaration de la maladie pendant la phase d'incubation qui varie de quelque jour à quelques mois (dépendante de la zone de morsure). Le virus gagne des zones de l'organisme où il pourra se multiplier :

- Le virus se réplique localement au niveau des myocytes avant d'atteindre le système nerveux périphérique (correspondant à l'incubation de longue durée) ou infecte directement les neurones pour migrer par voie axonale vers le système nerveux central à la vitesse de 25 à 50 mm par jour (**Rotivel, 2007**).
- Le virus remonte d'abord les nerfs périphériques (neurones) et arrive au niveau de la moelle épinière pour aboutir dans toutes les zones du cerveau (**Albertini, 2006**).
- Enfin, le virus se dissémine par voie axonale centrifuge à tout l'organisme (muscle, myocarde, rein, pancréas, tube digestif, glandes surrénales, cornée, peau, liquide lacrymal et salive). Le virus de la rage ne se retrouve pas dans le sang (**Figure 4**) (**Peigue-Lafeuille, H 2004**).
- Le dysfonctionnement neuronal induit par le virus semble être en rapport avec des modifications de la sécrétion et du re-captage de neurotransmetteurs (comme le GABA et la sérotonine) et non par des modifications histo-pathologiques (**Peigue Lafeuille, 2004 ; Rotivel, 2007**).

Le virus de la rage a une forte affinité pour les zones du cerveau ; c'est lorsque le virus atteint le système nerveux central que les signes cliniques peuvent apparaître, induisant souvent un comportement agressif chez l'animal ou la personne contaminée. D'importantes doses virales sont alors retrouvées au niveau des glandes salivaires. Les modifications comportementales liées à cette infection contribuent fortement à la transmission du virus à partir de l'animal contaminé, devenu enragé, à un autre hôte par une morsure (**Banerjee, 1987 ; Albertini, 2006**).

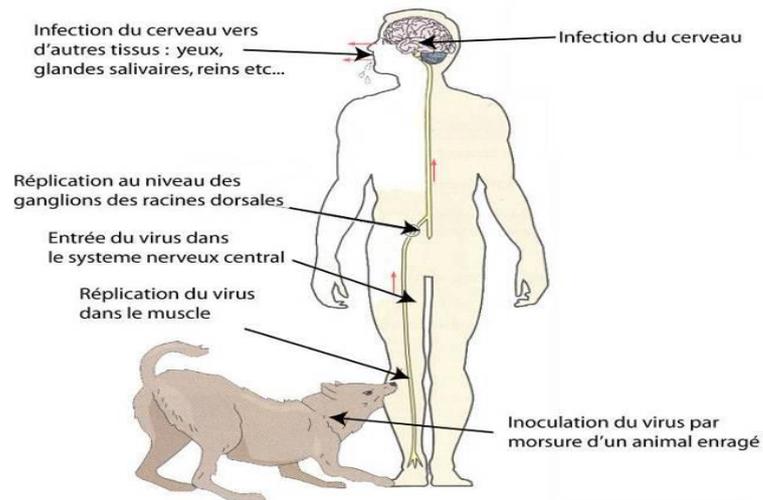


Figure 4: Physiopathologie de la rage (Albertini, 2006).

I.7. Diagnostic

I.7.1. Chez l'homme

- **En intra-vitam :** le diagnostic par cette méthode repose sur la recherche d'ARN viral par RT-PCR. Les prélèvements de choix sont :
 - La biopsie cutanée à la nuque avec présence de follicules pileux ;
 - La salive prélevée de façon séquentielle à la phase ultime de la maladie.
 Des prélèvements d'urine, du LCR ou de sérum peuvent être réalisés mais leur sensibilité diagnostique est beaucoup plus faible.
- **En post-mortem :** c'est la biopsie cérébrale à la recherche d'antigènes rabiques qui reste la méthode de référence. Le diagnostic peut se faire également sur biopsie de peau avec présence de follicules pileux (**Figure 5**).

I.7.2. Chez l'animal

Le diagnostic se fait en post-mortem et réside sur la mise en évidence d'antigènes rabiques ou l'isolement du virus à partir de l'encéphale (**Dacheux et al., 2009**).

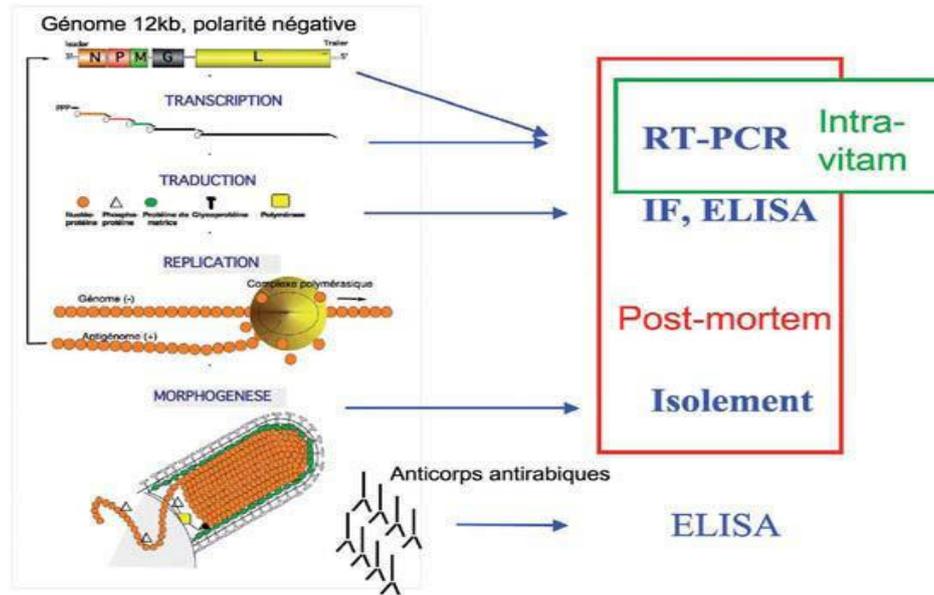


Figure 5: Méthodes de diagnostic au laboratoire de la rage (Dacheux *et al.*, 2009).

I.8. Traitement

Pour prévenir la rage il existe des vaccins sûrs et efficaces pour les animaux comme pour l'homme. Ils sont utilisables avant et après une exposition présumée. La vaccination préventive est recommandée chez tous les individus qui habitent ou voyagent dans des zones endémiques ou qui sont exposés au risque de la rage du fait de leur profession. Dans tous les cas avant l'apparition des premiers symptômes, il faut procéder à la vaccination (4 ou 5 injections réparties sur un mois), associée à une sérothérapie en cas de contact grave ou chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli (Mfupa Tchana, 2014).

I.8.1. Le traitement local

Toute plaie secondaire à une morsure doit être :

- Lavée rigoureusement la plaie à l'eau savonneuse.
- Rincée à l'eau.
- Désinfectée par un ammonium quaternaire.

Il n'y a pas de contre-indication à la suture si elle est nécessaire. Il est tout de même nécessaire de faire un parage soigneux (Mfupa Tchana, 2014).

I.8.2. Traitement général

Mis à part une éventuelle antibiothérapie pour traiter ou prévenir une infection de la plaie, et si besoin un vaccin antirabique, il sera pratiqué une sérothérapie et/ou une vaccinothérapie. L'utilisation des substances neuro-modulatrices pourrait modifier l'évolution

de l'infection rabique qui sert au dysfonctionnement des mécanismes neuronaux (**Mfupa Tchana, 2014**).

I.9. Prévention

La prévention repose sur l'information des personnes concernant le danger d'approcher ou contacter les animaux errants, notamment les chats et les chiens, et avec les animaux en liberté ou captifs. Elle repose sur les deux points suivants :

I.9.1. Prévention de la rage chez l'homme

Pour les personnes exposées par leur activité professionnelle (vétérinaires, taxidermistes, équarisseurs, équipes de laboratoires spécialisés, gardes forestiers), ainsi que les voyageurs, doivent avoir une vaccination préventive, avant contamination (**Pilly, 2013**). Elle se réalise par l'administration du vaccin (le même vaccin utilisé pour le traitement) par voie injectable à J0, J7 et J28 avec un rappel à un an puis tous les cinq ans si le risque persiste (**Mfupa Tchana, 2014**).

I.9.2. Prévention de la rage animale

Il faut faire vacciner les animaux suivants contre la rage : chiens, chats, bovins, chevaux, caprins, ovins et respecter les normes sanitaires en vigueur en cas d'importer un animal (réglementation de l'importation des animaux) (**Pilly, 2013**).

II. Vaccination antirabique

II.1. Historique de vaccination

La vaccination représente l'une des plus grandes avancées réalisées en santé publique :

- **Edward Jenner** : en 1796, Edward Jenner, un médecin anglais, constate qu'une maladie bénigne bovine, la vaccine, ressemble à la variole, maladie dont les paysannes trayant les vaches la contractant sont protégées lors des épidémies. Il a alors l'idée de transmettre la vaccine à un enfant, puis de lui inoculer la variole. Il observe que ce dernier ne développe pas la maladie. Le nom de "vaccination" est donné à cette opération.
- **Louis Pasteur** : un siècle plus tard, avec Louis Pasteur, l'idée d'atténuation de la virulence naît au laboratoire. Cette théorie a de nombreuses applications, notamment l'élaboration des vaccins contre le charbon et la rage.

- **Depuis le début du XXe siècle**, les vaccins n'ont pas cessé d'évoluer avec :
 - L'utilisation de toxines inactivées (anatoxines) ;
 - Le recours à des adjuvants augmentant l'efficacité vaccinale ;
 - L'apparition des vaccins combinés ;
 - L'introduction du génie génétique dans la fabrication du vaccin contre l'hépatite B (**Blin, 2018**).

II.2. Définition de la vaccination

Le mot vaccination vient du nom de la « variole des vaches », la vaccine, elle-même dérivée du latin : *Vacca* qui signifie « vache » (**Pommier, 2009**). La vaccination est l'administration d'un agent antigénique (le vaccin), pour stimuler le système immunitaire d'un organisme vivant afin d'y développer une immunité adaptative contre un agent infectieux. L'OMS estime que la vaccination est l'une des interventions sanitaires les plus efficaces et les plus économiques. En 2003, les autorités sanitaires estiment que la vaccination a évité plus de 2 millions de décès dans le monde (**Cliff et Smallman-Raynor, 2013**).

II.3. Définition du vaccin antirabique

Le vaccin est un produit biologique complexe administré pour provoquer une réponse immunitaire contre la maladie en stimulant la production d'anticorps. Les vaccins antirabiques contiennent soit des suspensions de micro-organismes atténués ou inactivés (**Guide Canadien d'immunisation, 2006**).

II.4. Les différentes souches vaccinales

Tous les vaccins rabiques sont fabriqués à partir des souches virales fixes, appelées aussi souches de laboratoire, qui dérivent principalement et historiquement de trois isolats de virus rabique qui sont :

- **La souche pasteur** : cette souche a été isolée en 1882 d'une vache mordue par un chien et qui a subi depuis des séries de passages très variés sur divers espèces animales ou cellules. Elle est à l'origine des souches CVS (*Challenge Virus Standard*), PV (Pasteur Virus) et PM (Pitman-Moore) (**Blancou, 1985 ; Mangué, 2009**).
- **La souche SAD** a été isolée en 1935 d'un chien mort de la rage des rues en Alabama (d'où son nom de Street Alabama Dufferin) et a subi plusieurs séries de passages sur souris, cellules de rein de Hamster, œuf embryonné, cellules de rein de porc, etc. (**Andral et Blancou, 1982**). La souche SAD est à l'origine des

souches SAD Berne, SAD B19, SAG-2 et ERA (Evelyn-Rokitnicki-Abelseth) (Mangué, 2009).

- **La souche Flury** a été isolée en 1939 de la jeune Miss Flury, décédée de la rage aux Etats-Unis suite à une contamination par un chien, et fut adaptée à l'œuf embryonné. Cette souche est à l'origine des souches *Flury Low Egg Passage* (L.E.P) après 50 passages et de la souche *Flury High Egg Passage* (H.E.P) après 130 passages supplémentaires (Andral et Blancou, 1982).

II.5. Types des vaccins

Depuis les premiers travaux de Pasteur, de nombreux vaccins antirabiques ont été développés. Pour les canidés, deux sortes de vaccins existent actuellement dans le monde (Reculard, 1999) :

- Vaccins à virus vivants (modifiés par passage sur œuf embryonné): LEP Flury, HEP Flury, Kelev ou ERA,
- Vaccins à virus inactivés, adjuvés ou non.

II.5.1. Les vaccins à virus vivants (atténués)

L'agent infectieux présent dans le vaccin a gardé la capacité de se multiplier chez l'hôte mais ne possède pas de caractère pathogène dans les conditions habituelles d'utilisation (Odile, 2007). Mais pour certains d'entre eux, il peut se produire dans ces vaccins un retour à la virulence, pouvant s'exprimer par le développement d'une rage mortelle. Ils ne sont pas agréés en France mais sont utilisés dans de nombreux pays étrangers. Ils sont plus fragiles à la chaleur que les virus inactivés et possèdent un bon pouvoir immunogène malgré un titre viral plus faible (Reculard, 1999).

II.5.2. Les vaccins à virus tués (inactivés)

Ils sont produits à partir des souches ayant subi un processus d'inactivation par un agent physique ou chimique qui vise à bloquer l'infection et leur pouvoir pathogène, sans dénaturer les antigènes induisant la réaction immunitaire chez l'individu vacciné (Odile, 2007). C'est les seuls vaccins autorisés en France. Ils sont contre indiqués pour les animaux trop jeunes ou soumis à une thérapeutique immunodépressive (Reculard, 1999).

II.5.2.1. Les vaccins dont le virus est répliqué *in vivo*

Ce type de vaccin est encore très répandu du fait de sa relative facilité de production du virus. Ce dernier peut être obtenu par inoculation d'animaux adultes ou non :

- Animaux adultes : les moutons, chèvres, lapins, rats et les souris sont les plus couramment utilisés permettant d'obtenir une récolte d'encéphales importante, mais de titre viral faible.
- Animaux jeunes ou nouveau-nés : les chevreaux, cabris, lapereaux, ratons et les souriceaux sont les plus utilisés permettant d'obtenir des récoltes de titre viral 10 à 100 fois supérieur à celui obtenu sur l'animal adulte, et un vaccin réputé dépourvu de facteur sensibilisant « neuro-allergène ».

II.5.2.2. Les vaccins dont le virus est répliqué *in vitro*

Il existe une assez grande variété de ce type de vaccin selon, leur substrat de réplication du virus ou la souche utilisée :

- Cellules des reins de hamster le plus souvent, mais aussi fibroblastes de poulet, cellules de rein de chien, de porc, etc.
- Souches : à l'exception de la souche Flury, la plupart sont dérivées de la souche Pasteur. Celle-ci a été isolée le 19 novembre 1882 d'un bovin et a subi, depuis, des séries de passages très variées sur diverses espèces animales ou cellules et redénommée « *Challenge Virus Standard* » (C.V.S); Pitman-More (P.M); Pasteur virus 11^{ème} passage (P.V.11); Kissling, etc. bien que l'OMS recommande de n'utiliser qu'une seule souche de virus rabique fixe pour la fabrication des vaccins (WHO, 1980).

II.5.2.3. Caractéristique des vaccins à virus inactivés

- **L'efficacité** : c'est-à-dire le niveau et la durée de l'immunité conférée, dépend surtout de l'équipement antigénique de la souche, des conditions de réplication du virus, de l'agent d'inactivation et de la valeur antigénique finale, qui ne doit pas être inférieur à 0,3 U.I. par dose (WHO, 1980) mais nécessairement trop élevée (Blancou *et al.*, 1981). La durée de l'immunité conférée peut, comme pour les vaccins non inactivés, atteindre deux à trois ans dans de bonnes conditions (Soulebot, 1980).
- Ils ne possèdent pas une virulence résiduelle ni de réversion.
- Ils ne sont pas assez fragiles face à la chaleur, quant aux vaccins à virus vivant (Thevenot, 2003).

I. Matériel

Dans notre travail, tout le matériel utilisé est fourni par l'institut Pasteur d'Algérie (annexe de Kouba).

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Souriceaux

Des portés de souriceaux (âgés de 3 à 4 jours) sont recommandés pour le test de virulence du virus vaccinal utilisé dans la préparation du vaccin antirabique.

I.1.2. Souris

Des souris de 14 à 16 g sont utilisées pour les tests de contrôle.

I.1.2.1. Elevage des souris

L'élevage des souris en nombre important permet de fournir des souriceaux nouveaux qui vont être inoculés avec le virus rabique à l'âge de 3 à 4 jours, dans le but de récolter la matière cérébrale riche en virus qui représente le principe actif du vaccin Vét.ERA.

I.1.2.2. Matériel permettant la mise en place d'un élevage des souris

- **Cage rectangulaire:** elle est utilisée pour l'élevage des souris en polycarbonate ou en polypropylène. Ces matières sont confortables et idéales pour l'élevage de ces animaux dans la production. La cage est nettoyée et désinfectée chaque semaine (**Figure 6**).



Figure 6 : Cage rectangulaire d'élevage.

- **Nourriture:** l'aliment fourni sous forme de granules est spécialement destiné aux animaux de laboratoire (souris, rats). Il est à base de maïs, orge, soja, de vitamines et de sel minéraux (**Figure 7**).

- **Eau d’abreuvement:** est de l’eau de robinet (l’eau de distribution publique). Après nettoyage, les biberons seront remplis d’eau (**Figure 7**).



Figure 7: Aliment pour souris et biberon pour eau d’abreuvement (un par cage).

- **Litière:** les matériaux de litière sont les copeaux de bois léger avec une épaisseur de 2 à 3 cm. On doit utiliser une litière sèche, absorbante, sans poussière, non toxique. La quantité de litière doit être suffisante pour permettre aux animaux d’être au sec avant le prochain nettoyage de la cage (**Figure 8**).



Figure 8: Aspect de la litière utilisée.

I.1.2.3. Reproduction

L’élevage des souris destinées à la fabrication de ce vaccin au niveau de l’Institut Pasteur d’Algérie (annexe de Kouba) a été faite de manière intensive. Le but étant d’avoir un grand nombre de souris et souriceaux nécessaires pour la fabrication des vaccins et aussi pour le contrôle *in Process* (en cours de la production).

- **Reproduction de type monogame**

Ce type d’élevage consiste à mettre un seul couple pubère (un mâle et une femelle à l’âge de la mise à la reproduction) par cage. Après la gestation qui dure environ 21 jours, les

souriceaux nouveau-nés vont rester 21 jours avec leur mère. Une fois sevrés, les jeunes souris vont être séparées selon le sexe. Elles sont donc casées dans des cages de stockage ; jusqu'à les utiliser pour les tests.

– Reproduction de type polygame

Plusieurs mâles et plusieurs femelles sont mis ensemble (3 mâles et 10 femelles). Les femelles sont retirées lorsque la gestation est apparente et placées dans des boîtes jusqu'à la mise bas où les souriceaux sont utilisés pour la prolifération du virus vaccinal (**Figure 9**). C'est une façon très efficace pour produire rapidement un grand nombre de souriceaux, mais elle ne permet pas de maintenir des registres très précis par rapport à la filialisation paternelle et empêche l'exploitation maximale du potentiel reproducteur des femelles.



Figure 9: Une femelle avec ces souriceaux.

I.1.2.4. Hygiène au sein de l'animalerie

L'hygiène doit être rigoureuse au sein d'une animalerie et les employés doivent savoir l'application des bonnes pratiques de nettoyage et de désinfection car elle est importante et nécessaire pour la prévention des maladies. L'hygiène au niveau de l'animalerie se fait par:

- ✓ Nettoyage et mesure sanitaire : tous les enclos, les cages et les équipements doivent être nettoyés et désinfectés avant et après chaque utilisation.
- ✓ Stérilisation: les cages, les bouteilles d'eau et d'autres pièces du matériel devront être utilisés dans l'animalerie ou à l'intérieur des zones spécifiques doivent être stérilisés avant l'utilisation.

I.1.3. Virus vaccinal

La prolifération du virus se fait par infection d'un tapis de cellules de 24 h, inoculées pendant 4 jours dont la récolte du surnagent s'effectue au 5^{ème} jour.

I.1.4. Souche virale

La souche CVS (*Challenge Virus Standard*) est entretenue au service depuis des années. Elle est utilisée comme virus d'épreuve dans le test d'activité des vaccins antirabique (NIH).

I.1.5. Vaccins

– Vaccin antirabique à usage vétérinaire (ou vaccin à tester)

Le vaccin est préparé à partir de la souche EBS5. Cette dernière est issue après avoir cultivé la souche ERA sur la ligné BSR, en mode stationnaire et récolté au 5^{ème} jour après l'inoculation. Il est conservé à -80°C.

– Le vaccin de référence

C'est le vaccin antirabique à usage humain (vaccin lyophilisé), produit à partir de la souche LPS (Louis Pasteur Saigon) sur cerveau de souriceaux nouveau-nés. Il est utilisé comme vaccin de référence interne après une dizaine de titrage et calculé par rapport au vaccin de référence (OMS).

I.1.6. Milieux de culture

Les milieux de culture nécessaires pour cette étude sont: le Bouillon nutritif et le milieu Sabouraud liquide. Ces milieux sont préparés par l'IPA pour le test de stérilité.

I.1.7. Tampon de dilution

Les tampons utilisés lors notre étude sont: le tampon Enders et le tampon lactose, qui est obtenu après mélange de plusieurs produits.

I.2. Matériel de manipulation

L'ensemble de matériel utilisé dans cette étude est présenté dans le tableau 2.

Tableau 02 : Matériel utilisé durant la manipulation.

Moyens de protection pour le personnel	Seringues	Autres matériels
Lunettes, combinaison, masques et gants à usage unique.	<ul style="list-style-type: none"> - Seringue Cornwall (pour la distribution) - Seringue à usage unique de 2,5 ml (pour la vaccination des souris) - Seringue à usage unique de 1 ml (pour le challenge et le test de virulence). 	Tubes à essai avec des portoirs, micropipettes, bac de la glace, vortex, grille pour comptage des souris, béchers, flacons de 500 ml, barreaux, pompe à vide, balance électronique, Bec Bunsen, hotte à flux laminaire, réfrigérateur, congélateur.

II. Méthodes

II.1. Préparation du tampon lactose

Tout d'abord à l'aide d'une balance électrique, on pèse : 2,88 g de $C_5H_9NO_4$; 1,78 g de KH_2PO_4 ; 5,72 g de K_2HPO_4 ; 1,096 g de KOH et 260 g de $C_{12}H_{22}O_{11}$ où il faut mettre chaque quantité séparément dans des papiers d'aluminium. Ensuite, un flacon de 3 L est placé sur l'agitateur magnétique avec une quantité d'eau stérile (l'eau du réservoir est de 2 L). Afin de faciliter la dissolution des produits, le flacon est placé dans un bac d'eau chaude. Puis, on ajoute graduellement du lactose à l'intérieur de ce flacon sous agitation. Après dissolution complète du lactose, on ajoute les autres quantités pesées de la même manière. Vers la fin et après l'addition complète du volume d'eau stérile (volume final 2 L), on ferme le flacon avec un morceau du papier aluminium avec une feuille entourée par un fil pour éviter toute contamination (**Figure 10**). Ce tampon a subi une filtration stérilisante sur une série d'une membrane multi-pores 0,8, 0,45 et 0,02 μm sous hotte (**Figure11**) avant d'être réparti dans des flacons stériles de 100 ml (**Figure 12**), qui sont conservés au réfrigérateur jusqu'au le moment d'utilisation.

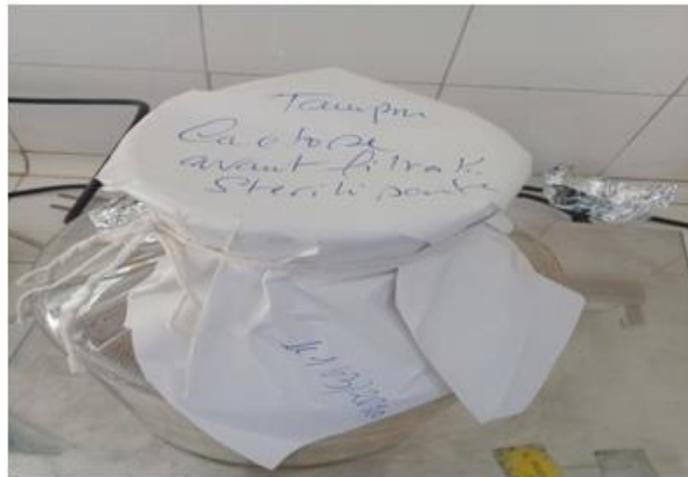


Figure 10: Tampon lactose avant filtration stérilisante.



Figure 11: Filtration stérilisante sous hotte.



Figure 12: Tampon lactose préparé.

II.2. Préparation des vaccins

Trois types de vaccin ont été préparés A, B et C. Toutes les opérations ont été effectuées sous hotte à flux laminaire afin d'éviter toute contamination accidentelle.

- **Vaccin V/V (vaccin A):** dans un flacon de 500 ml, on verse 50 ml du tampon lactose puis on rajoute 50 ml du virus rabique EBS5. Après homogénéisation par agitation magnétique, on aura 100 ml du vaccin A à la dilution $\frac{1}{2}$ (vaccin A avant BPL).
- **Vaccin V/3V (vaccin B):** dans un flacon de 500 ml, on introduit 75 ml de tampon lactose puis on rajoute 25 ml du virus rabique EBS5. Après mélange, on aura 100 ml du vaccin B à la dilution $\frac{1}{4}$ (vaccin B avant BPL).
- **Vaccin V/9V (vaccin C):** cette fois, on ajoute 10 ml du virus rabique EBS5 à 90 ml du tampon lactose dans un flacon de 500 ml ce qui donne 100 ml du vaccin C à la dilution $\frac{1}{10}$ (vaccin C avant BPL).

Durant l'opération, les flacons des vaccins doivent être entourés par des portes glaçons pour éviter la chute du titre viral. Les flacons contenant les trois vaccins produits sont fermés de façon hermétique et enveloppés par le papier aluminium. Deux échantillons sont prélevés pour chaque vaccin afin de contrôler la virulence initiale et la stérilité avant l'inactivation par la BPL.

III.3. L'inactivation des vaccins (A, B et C) par BPL

L'inactivation du virus se fait par l'ajout de la BPL (β -propiolactone). Les vaccins A, B et C sont transportés vers l'hotte dans des portes glaçons afin d'éviter la chute du titre viral. Pour chaque flacon, on prépare un mélange de 25 μ l de BPL avec 5 ml du tampon lactose ; dont le facteur de dilution est de $(\frac{1}{4000})$ ml. Les flacons sont mis sous agitation pendant 4 h à température ambiante. Ensuite, un volume de 0,2 ml de Méthiolate (conservateur) est additionné dans chaque vaccin ; dont le facteur de dilution est $(\frac{20}{10000})$ ml. Un prélèvement en double est réalisé, l'un pour le contrôle de l'inactivation (recherche de la virulence résiduelle) et l'autre pour le contrôle de la stérilité.

III.4. Répartition du vaccin antirabique

Après l'inactivation par la BPL, les flacons du vaccin A, B et C vont être réparties dans des petits flacons fermés par des bouchons en élastomère puis capsulés (**Figure 13**). Ces petits flacons sont placés par la suite dans des boites d'emballage bien marquées, puis conservés au réfrigérateur et seront utilisés pour le contrôle d'efficacité du vaccin par le test NIH.



Figure 13: Répartition des vaccins sous hotte à flux laminaire.

II.5. Contrôle d'efficacité des vaccins

II.5.1. Test de stérilité (*in vitro*)

Le test de stérilité est effectué pour la suspension virale avant et après l'inactivation. Les milieux de cultures suivants sont utilisés pour l'épreuve de stérilité: le milieu Sabouraud liquide et le bouillon nutritif, pour la recherche des mycètes et des germes bactériens aérobies respectivement. Ces milieux sont ensemencés par 1 ml de la suspension vaccinale à tester (le vaccin EBS5 et les vaccins A, B et C avant et après l'inactivation) puis sont incubés à 37°C. La lecture se fait pendant les 14 jours d'incubation (**Annexe 1**).

Si aucune croissance de microorganisme n'est observée dans les bouillons ensemencés pendant la période d'incubation (14 jours) et à la fin de celle-ci, la préparation examinée est considérée comme stérile. Si c'est le contraire, la multiplication des microorganismes se traduit par une turbidité du bouillon.

II.5.2. Test de virulence initiale (*in vivo*)

Le test de virulence initiale a pour but de déterminer le titre en virus dans la suspension avant l'inactivation (**Annexe 2**).

II.5.2.1. Préparation de l'inoculum

Elle correspond à une étape de préparation des séries de dilution où pour chaque vaccin on va présenter les différentes étapes de cette démarche.

❖ Vaccin EBS5

A l'aide d'une seringue Cornwall, on introduit 4,5 ml du tampon lactose dans chaque tube (7 tubes à essai stérilisés, fermés par un bout de coton et étiquetés). Puis on ajoute 0,5 ml

du virus à tester par micropipette dans le premier tube pour obtenir la dilution 10^{-1} . Cette dilution doit être mise sous vortex pour bien mélanger le contenu. Pour obtenir la deuxième dilution 10^{-2} , on dépose 0,5 ml de la première dilution dans le deuxième tube et ainsi de suite pour la troisième et la quatrième jusqu'à la septième dilution (**Figure 14**). Pour ne pas fausser les résultats, il faut changer la pointe de la micropipette pour chaque dilution.

Pour éviter la chute du titre viral, il est nécessaire de mettre les dilutions dans un bain d'eau glacée pendant toute la durée du test.

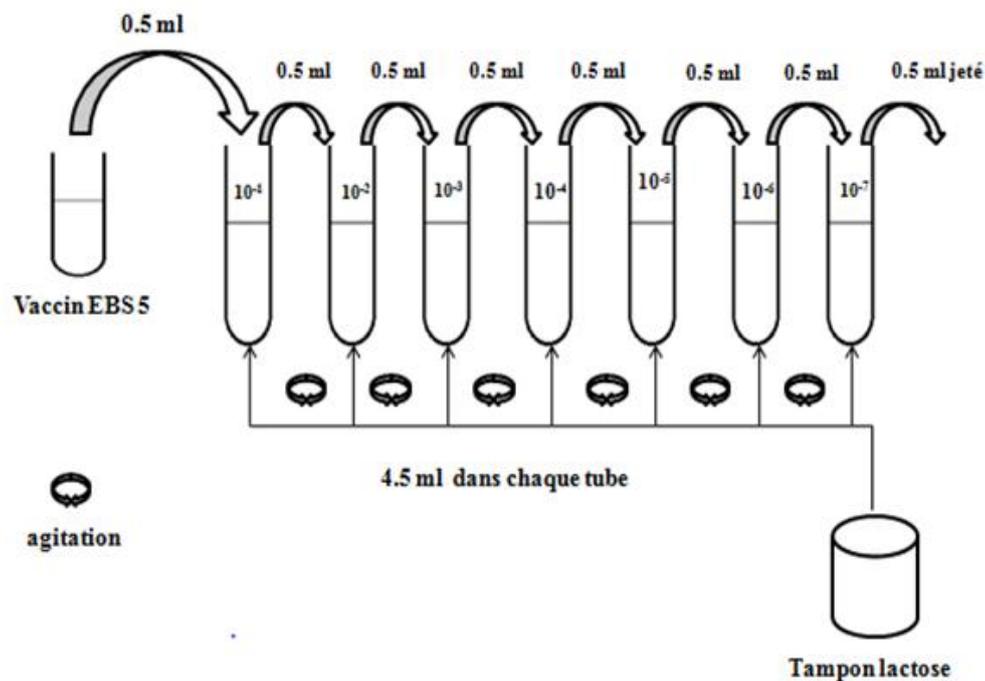


Figure 14: Schéma explicatif des dilutions de la suspension virale ERA en vue du titrage initial.

❖ Vaccin A

Pour le vaccin A, sept tubes à essai stérilisés, étiquetés et fermés par un bout de coton déposés sur le portoir sont remplis par 4,5 ml du tampon lactose en utilisant une seringue Cornwall. Ensuite, le petit flacon du vaccin A est décongelé sous l'eau de robinet. A l'aide d'une micropipette, on prélève un volume de 0,5 ml qui est introduit dans le premier tube pour obtenir la dilution 10^{-1} , ce tube est homogénéisé à l'aide de vortex. Par la suite, un volume de 0,5 ml de la dilution 10^{-1} est prélevé puis déposé dans le deuxième tube pour avoir la dilution 10^{-2} . Cette opération est répétée 5 fois pour obtenir les dilutions de 10^{-3} à 10^{-7} (**Figure 15**).

❖ Vaccin B et C

La préparation des dilutions des vaccins B et C est réalisé de la même manière que le vaccin A.

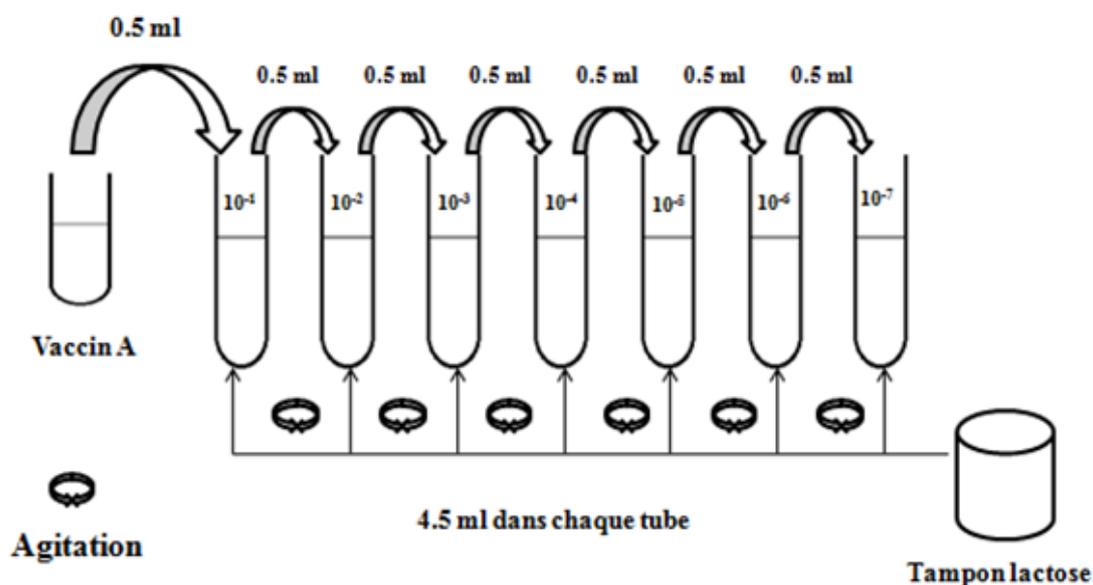


Figure 15: Schéma explicatif des dilutions du vaccin A avant BPL.

II.5.2.2. Inoculation des souriceaux

❖ EBS5

La suspension virale EBS5 est inoculée par voie intracérébrale (I/C), à l'aide d'une seringue de 1 ml. On inocule un volume de 0,02 ml/souriceau dans quarante souriceaux pour les dilutions 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} (10 souriceaux par chaque cage) (Figure 16). Chaque groupe est mis dans une cage identifiée par la dilution correspondante, la souche du virus utilisée et la date d'inoculation.



Figure 16: Inoculation de la suspension virale par voie intracérébrale.

❖ Vaccin A, B et C

L'inoculation de ces vaccins a été faite selon le même protocole d'inoculation d'EBS5.

II.5.2.3. Lecture de la fiche de contrôle de la virulence initiale

Les souriceaux sont mis sous observation pendant 14 jours. On note quotidiennement les signes cliniques liés à la rage (vivants, paralysés et morts).

II.5.2.4. Détermination du titre viral

Le titre viral est exprimé en DL₅₀ (dose létale 50%) et calculé à partir des signes cliniques précédents. Il est déterminé selon la méthode de SPERMAN et KARBER (**Annexe 3**).

II.5.3. Test de virulence résiduelle (*in vivo*)

Le test de virulence résiduelle est réalisé pour apprécier l'inactivation du virus rabique par la BPL (β -propiolactone) dans la préparation vaccinale. Deux portés de souriceaux sont inoculés par voie intracérébrale à raison de 0,02 ml pour chaque vaccin (A, B et C) et on les observe pendant les 14 jours (**Annexe 4**).

L'injecteur doit suivre les instructions nécessaires (porte des lunettes, combinaison, masque et gants à usage unique) pour garantir des résultats précis.

II.5.4. Le test d'activité des *National Institutes of Health* (NIH)

Le principe du test NIH consiste à immuniser des souris avec des concentrations variables du vaccin, puis les soumettre à une épreuve virulente avec une dose variante entre 5 et 50 DL₅₀ de la souche virale d'épreuve CVS (*Challenge Virus Standard*). On calcule ensuite le taux de protection (DE₅₀) conféré par le vaccin testé et par le vaccin de référence.

Dans notre étude, le test NIH est réalisé pour les vaccins préparés A, B, C et le vaccin de référence.

II.5.4.1. Préparation de l'inoculum

Quatre séries de dilution sont réalisées, une pour chacun des vaccins suivants: vaccin A, vaccin B, vaccin C et vaccin de référence.

❖ Vaccin A

Pour le vaccin A, quatre tubes à essai stériles et étiquetés déposés sur le portoir sont remplis par 8 ml de la solution Enders (tampon de dilution) à l'aide d'une seringue Cornwall. Ensuite, le vaccin A est décongelé sous l'eau de robinet et un volume de 2 ml est prélevé par pipette graduée et introduit dans le premier tube pour avoir la dilution 1/5. La solution

vaccinale est homogénéisée par vortex, puis une quantité de 2 ml est prélevée de cette dilution et déposée dans le deuxième tube pour obtenir la dilution 1/25 et ainsi de suite pour les autres dilutions (1/125, 1/625) (**Figure 17**).

Nous avons inoculé 5 portés de souris (10 souris adultes par cage), une pour le vaccin A pur et les autres pour 1/5, 1/25, 1/125 et 1/625.

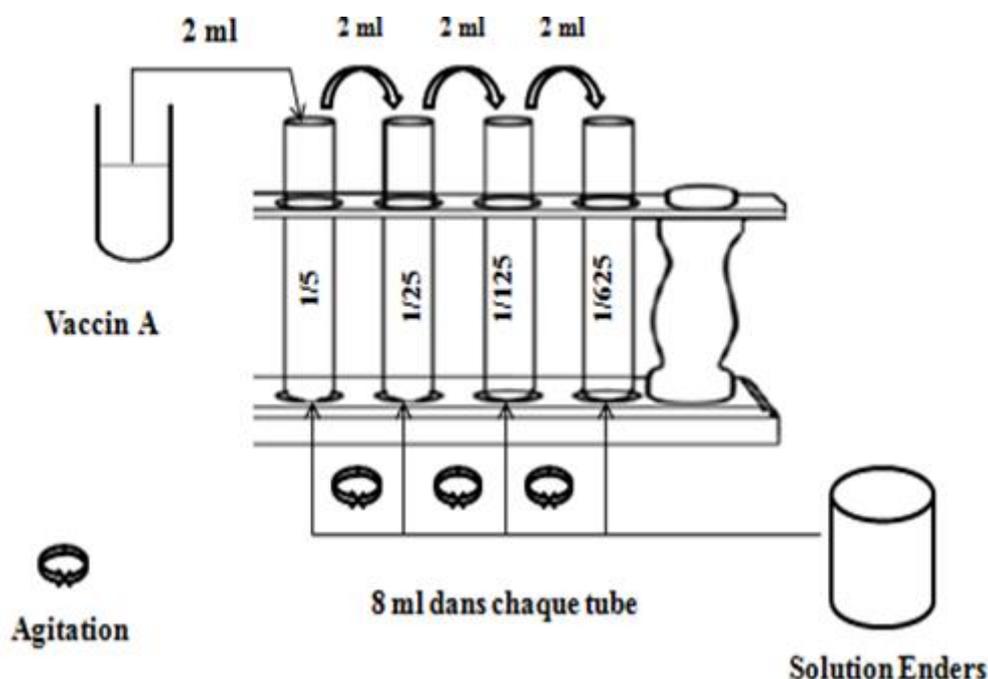


Figure 17: Préparation de la série de dilution de facteur 5 pour le vaccin A.

❖ Vaccin B et C

Pour le vaccin B et C, nous avons procédé la même démarche pour avoir la deuxième et la troisième série de dilution.

❖ Vaccin de référence

Concernant le vaccin de référence, l'inoculum est préparé à partir du vaccin rabique à usage humaine lyophilisé. Deux flacons de vaccin sont dilués par l'eau bi-distillée (2 ml pour chaque flacon) puis homogénéisés par vortex. Ensuite, une série de dilution de facteur 5 est réalisée. Nous avons rempli cinq tubes à essai bien marqués par 8 ml de la solution Enders. Un volume de 2 ml de ce vaccin est prélevé à l'aide d'une pipette de 2 ml puis transféré dans le premier tube pour avoir la première dilution 1/5. Après homogénéisation, un volume de 2 ml est prélevé de cette dilution et versé dans le deuxième tube pour obtenir la dilution 1/25 et ainsi de suite pour les dilutions 1/125, 1/625 et 1/3125.

II.5.4.2. Inoculation des souris

❖ La première vaccination

Dix souris adultes (de 14 à 16 g) sont inoculées par voie intra-péritonéale (I/P) avec 0,5 ml de chacune des dilutions à l'aide d'une seringue à 2,5 ml après désinfection de la paroi abdominale des souris par l'alcool iodé.

❖ La deuxième vaccination

La seconde vaccination consiste à injecter à chaque souris la même dose vaccinale par voie d'injection identique, qui se fait le 7^{ème} jour suivant après la première vaccination en suivant le même protocole de vaccination (**Figure 18**).



Figure 18: Inoculation par voie intra-péritonéale des souris par les vaccins.

II.5.4.3. Test d'épreuve sur souris (challenge)

Toutes les souris sont éprouvées par voie intracrânienne 14 jours après l'administration de la première dose du vaccin.

II.5.4.3.1. Préparation de la souche de provocation CVS

Tout d'abord une ampoule de sérum à cheval est décongelée et additionnée à 200 ml d'eau bi-distillée (sérum de cheval à 2%) pour obtenir la solution de dilution.

Une ampoule de virus CVS (*Challenge Virus Standard*) est décongelée rapidement sous l'eau de robinet et homogénéisée. Une série de six tubes à essai est préparée pour faire les dilutions successives. Le premier tube est rempli par 4,5 ml de la solution de dilution puis un volume de 0,5 ml de la suspension virale CVS est introduit dans ce tube pour avoir la dilution 10^{-1} , ce tube est homogénéisé à l'aide d'un vortex. 0,5 ml de cette dilution est prélevé à l'aide

d'une pipette graduée puis introduit dans le 2^{ème} tube contenant 4,5 ml de la solution de dilution pour obtenir la dilution 10^{-2} . Pour le troisième tube, les mêmes étapes sont effectuées pour avoir la dilution 10^{-3} . Un volume de 1 ml de la dilution précédente est ajouté à un tube à essai rempli par 8 ml de la solution de dilution, ce qui permet de préparer la dilution $10^{-3,90}$. Le CVS dilué à $10^{-4,90}$ est obtenue par l'addition de 0,5 ml de la dilution $10^{-3,90}$ au 5^{ème} tube rempli par 4,5 ml de la solution de dilution. Pour la dernière dilution $10^{-5,90}$, les mêmes étapes de la quatrième dilution sont effectuées (**Figure 19**). Les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} sont éliminées et les dilutions $10^{-3,90}$, $10^{-4,90}$ et $10^{-5,90}$ sont inoculées.

Pour éviter une diminution du titre viral, il est nécessaire de mettre les dilutions dans un bain d'eau glacée pendant toute la durée du test.

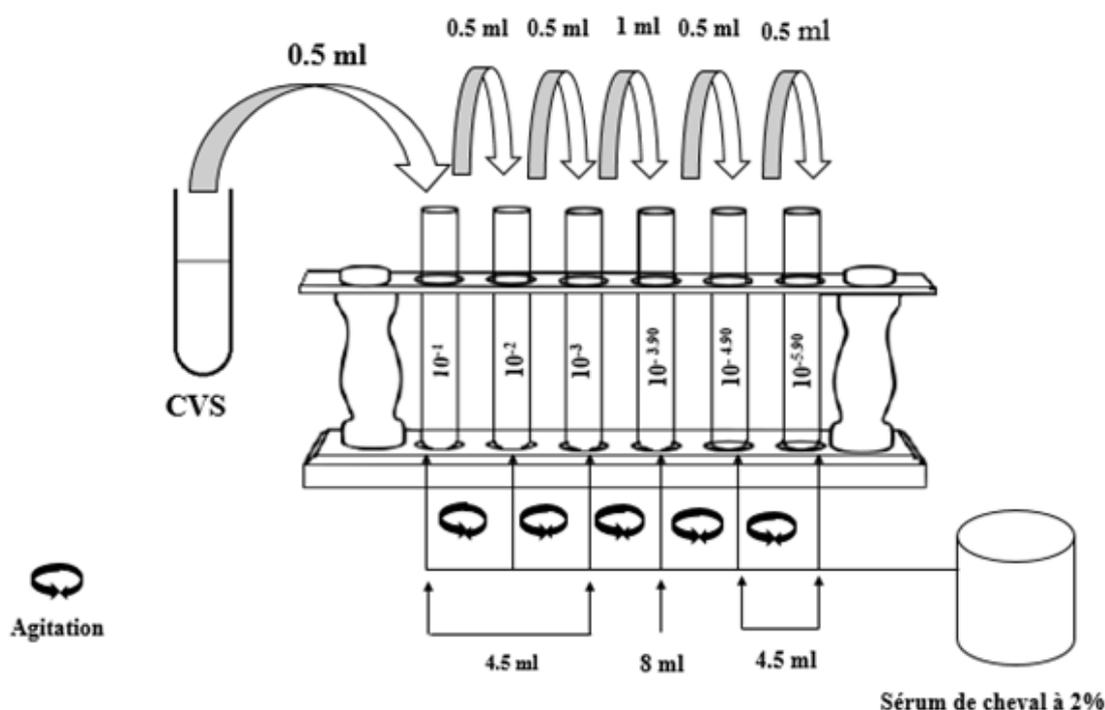


Figure 19: Schéma explicatif de la préparation des dilutions du virus CVS.

II.5.4.3.2. Inoculation des souris

Toutes les souris immunisées sont inoculées par 0,03 ml de la dose d'épreuve CVS par voie intracérébrale. Parallèlement aux souris éprouvées, 30 souris de 14 à 16 g non vaccinées (témoin) sont inoculées par le CVS (par voie I/C) à raison de 0,03 ml par souris à des dilutions de $10^{-3,90}$, $10^{-4,90}$, $10^{-5,90}$ (10 souris pour chaque dilution) dans le but de déterminer la DL_{50} réelle obtenue lors de ce travail (**Figure 20**). Il est recommandé d'injecter d'abord la dilution la plus faible puis la dilution la plus forte. De cette manière, une seule seringue de 1 ml sera utilisée pour éprouver l'ensemble des souris.



Figure 20: Inoculation par voie intracérébrale des souris par les vaccins.

II.5.4.4. Lecture de la fiche du test d'activité des NIH

Toutes les souris sont observées pendant 14 jours à partir du jour de l'inoculation d'épreuve. Durant cette période, les souris présentant des signes de la rage à virus fixe (paralysie, convulsion), les vivants et les morts sont notées dans la fiche clinique (**Annexe 5**).

II.5.4.1. Calcul du pouvoir protecteur (valeur antigénique)

❖ Calcul de la DE_{50}

La DE_{50} (la dose efficace médiane) du vaccin à tester et des vaccins de référence est calculée sur la base du nombre de survivants selon la méthode de REED et MUNCH (**Annexe 6**).

❖ Calcul de la valeur antigénique (VA)

Il faut utiliser une méthode volumétrique, dans laquelle on compare la dilution au point 50% (dilution du vaccin protégeant des souris) du vaccin contrôlé à celle de l'étalon international (ou du vaccin de référence national équivalent) (**Annexe 7**).

II.9.4.2. Détermination de la DL_{50} du virus d'épreuve CVS

La DL_{50} (la dose létale 50) du virus CVS est déterminée selon la méthode de SPERMAN et KARBBER (**Annexe 8**).

I. Résultats

Dans le but de déterminer la dose létale minimale du virus rabique afin de produire un vaccin antirabique inactivé à usage vétérinaire et mettre en évidence le seuil minimal de cette dose qui protège contre la rage, nous avons effectué :

- Un test de virulence initial : test de titrage initial pour l'EBS5 et les trois vaccins (A, B et C) avant l'inactivation.
- Un test de virulence résiduelle après avoir utilisé la BPL pour les vaccins A, B et C.
- Un test d'activité des NIH sur les vaccins antirabiques inactivés.

Un contrôle de stérilité est réalisé sur l'EBS5 et les trois vaccins (A, B et C) traités par la BPL avant de commencer nos tests. Selon les résultats obtenus, nous avons observé l'absence totale des contaminations fongique et bactérienne même après 14 jours d'incubation, ce qui confirme la stérilité des vaccins préparés et reflète le respect des conditions d'asepsie exigées durant les différentes étapes de la manipulation.

I.1. Détermination du titre viral des différentes dilutions du vaccin antirabique vivant

Afin de déduire la dose létale d'EBS5, nous avons réalisé un test de virulence initial sur un certain nombre de souriceaux, en réalisant différentes dilutions pour l'EBS5 et les trois vaccins antirabiques avant le traitement par la BPL. Les titres viraux des différents vaccins sont présentés comme suite (**Tableau 3**).

Tableau 03: Les titres viraux des différents vaccins.

	EBS5	Vaccin A	Vaccin B	Vaccin C
Titre viral	$DL_{50} = 10^{-6,3}$	$DL_{50} = 10^{-6}$	$DL_{50} = 10^{-4,9}$	$DL_{50} = 10^{-4,7}$

DL50: dose létale 50

D'après ces résultats, on constate que la masse virale est plus importante dans les vaccins les moins dilués, donc le titre viral est inversement proportionnel à la dilution, c'est-à-dire à chaque fois en dilue le vaccin EBS5, la charge virale diminue. En effet, le titre viral du vaccin EBS5 est supérieur à celui trouvé dans les autres vaccins A, B et C.

I.2. Test de virulence résiduelle après l'inactivation par la BPL

Le test de la virulence résiduelle doit être réalisé après l'ajout de la BPL afin de confirmer l'inactivation totale des vaccins antirabiques.

Les résultats observés sur les souris après les inoculées par les vaccins inactivés peuvent nous confirmer l'inactivation totale des vaccins (**Tableau 4 et Annexe 4**).

Tableau 04: Les observations obtenues après le test de virulence résiduelle.

Vaccin	Vaccin A	Vaccin B	Vaccin C
Observation	Nulle	Nulle	Nulle

I.3. Mise en évidence du pouvoir protecteur du vaccin A, B et C (inactivés) et le vaccin de référence

Pour les essais effectués sur les trois vaccins (A, B, C) et le vaccin de référence en l'occurrence qui est **S239** dont la **VA = 1,89** ; la dilution d'épreuve de virus CVS utilisé est **10^{-3,9}** dont sa **DL₅₀** théorique d'épreuve est de **10^{-5,8}** ce qui permet d'escompter l'utilisation de **79** de **DL₅₀**. L'ensemble des résultats obtenus sont rassemblés dans le **Tableau 5**.

Tableau 05: Les doses efficaces 50 et les valeurs antigéniques des vaccins A, B, C et la dose létale 50 du virus CVS.

	Vaccin A	Vaccin B	Vaccin C	Vaccin de référence	DL ₅₀ du CVS	Nombre théorique DL ₅₀ du CVS	Nombre de DL ₅₀ réels
DE50	1,8	0,9	2,00	1,96	10 ^{-5,8}	30DL ₅₀	79DL ₅₀
VA	1,28	0,16	2,02	1,89			

VA: valeur antigénique, DE50: dose efficace médiane, CVS: la souche *Challenge Virus Standard*.

I.3.1. Taux de protection induit par les vaccins A, B, C et le vaccin de référence

Afin d'évaluer la protection conférée par les vaccins A, B et C, nous avons analysé la fiche clinique du test des NIH et calculé le taux de survie des souris inoculées par les différentes doses vaccinales des différents vaccins (A, B, C et référence). Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 6**.

Tableau 06: Taux de survie des souris en fonction des dilutions des vaccins A, B, C et le vaccin de référence.

Lot de souris ayant reçu les dilutions du vaccin	Vaccin A			Vaccin B			Vaccin C			Vaccin de référence		
	Nbr	S	S%	Nbr	S	S%	Nbr	S	S%	Nbr	S	S%
Pur	8	7	87,5	8	6	75	7	7	100	10	10	100 (théorique)
1/5	10	6	60	8	3	37,5	8	3	37,5	9	8	80,88
1/25	9	3	33,33	8	0	12,5	8	2	25	9	4	44,44
1/125	8	0	0	8	0	0	9	0	0	8	3	37,5
1/625	9	1	11,11	8	0	0	10	0	0	9	1	11,11
1/3125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	0	0
Taux de survie des souris (%)	38,38			22,5			32,5			34,78		

Nbr : Nombre de souris ; S : souris survivantes ; S% : Taux de survie

Ces résultats indiquent que le taux de survie est élevé chez les souris vaccinées par le vaccin A par rapport aux souris vaccinées par le vaccin de référence ainsi que le vaccin B et C. On déduit également que la variation du taux de survie des souris ayant reçu des doses vaccinales du vaccin C et du vaccin de référence est quasiment similaire.

D’après nos données, nous avons noté avec intérêt que le taux de survie des souris qui ont été vaccinées par la dose pur pour chacun des 3 vaccins est assez important (supérieur à 50%). Par la suite, nous avons remarqué une diminution du pourcentage de survie de tous les groupes ayant reçu les vaccins B, C par rapport aux groupes vaccinés par le vaccin « A » et le vaccin de référence à la dilution 1/5. Par contre, les souris immunisées par le vaccin C dilué à 1/25 montrent une augmentation du taux de survie (25%) par rapport aux souris vaccinées par le vaccin B à la même dilution. Nous avons remarqué aussi qu’un taux de survie nul a été obtenu après traitement des souris par le vaccin A à la dilution de 1/125 qui a été augmenté à 11,11% pour la dilution 1/625.

I.4. Analyse comparative de l'efficacité des vaccins testés

Dans le cadre de mettre en évidence l'efficacité des différents vaccins testés A, B et C, nous avons effectué une analyse comparative entre les résultats des expériences effectuées. Les doses efficaces 50 ainsi que les valeurs antigéniques sont calculées. Les valeurs obtenues sont représentées sous forme des histogrammes (Figure 21 et 22).

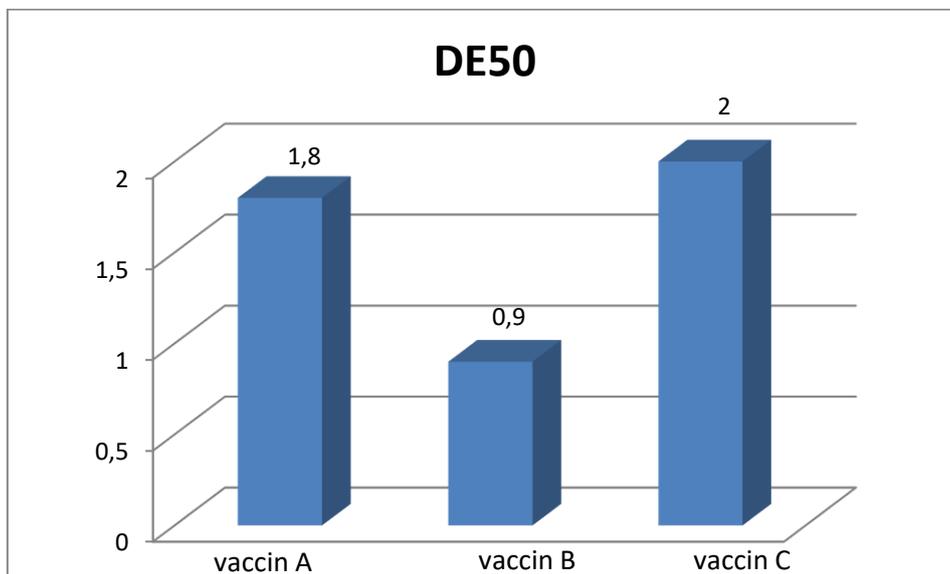


Figure 21: Variation de la dose efficace 50 en fonction des vaccins A, B et C.

L'analyse faite sur les résultats présentés indique que tous les vaccins EBS5 sont des vaccins efficaces où ils apportent une protection contre le virus CVS.

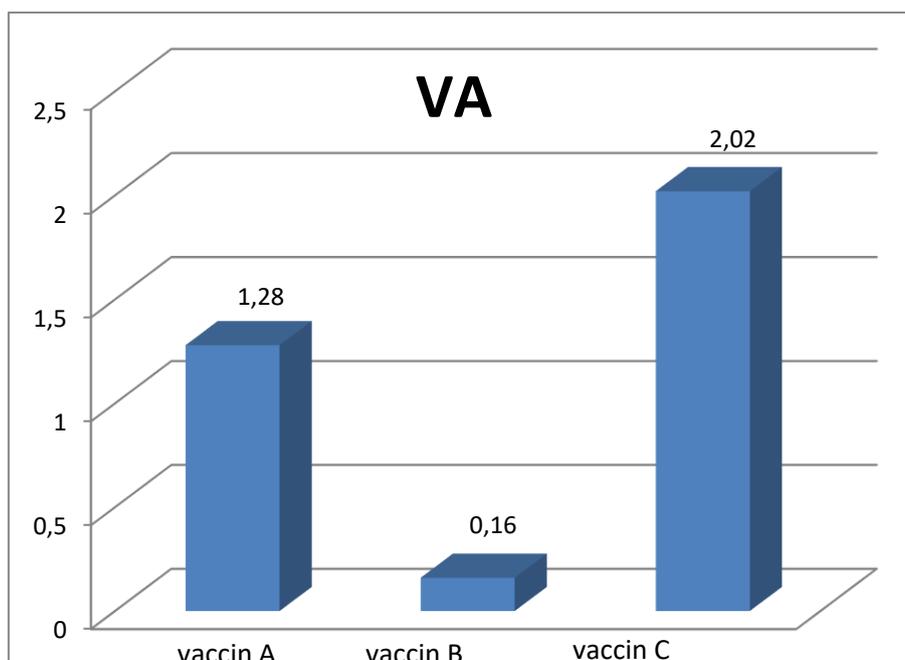


Figure 22: Variation des valeurs antigéniques en fonction des vaccins EBS5 testés.

Les résultats de calcul des valeurs antigéniques des vaccins EBS5 ont permis de révéler que les vaccins A et C induisent une protection contre le virus rabique étant donné qu'ils ont une VA supérieure à 0,3.

D'après le **Tableau 7**, nous avons révélé que le pourcentage de protection des souris immunisées varie selon le vaccin administré. En effet, nous avons observé l'existence d'une relation proportionnelle avec une corrélation positive entre les doses initiales et le pourcentage de protection du vaccin antirabique EBS5.

Tableau 07: Pourcentage de protection des différents vaccins préparés A, B et C.

Vaccin : titres viraux	A: 10^{-6}	B: $10^{-4,9}$	C: $10^{-4,7}$
Pourcentage de protection (%)	38,38	22,5	32,5

Au regard global de nos résultats, nous pouvons conclure que tous les vaccins EBS5 (A, B et C) ont un pouvoir protecteur contre le virus de la rage avec des degrés de protection qui varie selon le titre viral.

II. Discussion

II.1. Les différentes doses initiales du vaccin EBS5

Les titres viraux du travail exécuté (les différentes dilutions d'EBS5) sont déterminés et confirmés pratiquement par le test de virulence *in vivo*. Néanmoins, il est préférable de réaliser ce dernier *in vitro* en utilisant la technique d'immunofluorescence qui est aussi plus fiable et plus rapide. On a arrivé à confirmer qu'il y'a une corrélation entre les titres trouvés et les dilutions effectuées.

II.2. Test d'activité des NIH pour les vaccins EBS5 (A, B et C)

Nos résultats du test d'activité des NIH montrent que les vaccins A et C ont une DE50 élevée comparée à celle du vaccin B, et par la suite on trouve que les deux vaccins expertisés (A et C) ont une valeur antigénique supérieure à 0,3 contrairement au vaccin B ; dont le vaccin C qui est le plus dilué (1/10) montre la plus grande valeur. Alors que dans la logique sa VA doit être moins que les deux autres vaccins. Cela est expliqué par l'état sanitaire douteux des groupes de souris réservés pour l'immunisation par les vaccins A et B, en particulier le B.

A travers l'analyse des données obtenues sur l'activité des vaccins EBS5 (A, B et C), nous pouvons conclure que les vaccins A et C sont efficaces et capables d'induire une réponse immunitaire protectrice contre le virus CVS (protègent les souris vaccinées contre la

maladie). Alors que pour le vaccin B, il est préférable de refaire le test afin de confirmer la logique des résultats.

II.3. Degré de protection conféré par les vaccins EBS5

Les résultats sont différents selon le vaccin à tester, A ($DL_{50} = 10^{-6}$) et C ($DL_{50} = 10^{-4,7}$) assurent une bonne protection pour les souris immunisées étant donné que le degré de protection conféré est de 38,38 et 32,5% ; tandis que le taux de survie des souris vaccinées par le vaccin B ($DL_{50} = 10^{-4,9}$) est de 22,5%. Cela est probablement dû à une faible réponse immunitaire induite par le mauvais état sanitaire des souris qui est probablement responsable des morts accidentelles ou bien il y'avait des erreurs de manipulation et/ou les conditions opératoires, sachant que toutes les souris sont challengées par le même titre du virus CVS ($DL_{50} = 10^{-5,8}$), ce qui nécessite un temps plus long pour l'installation d'une bonne réponse immunitaire.

II.4. Etude comparative entre la dose initiale et le pouvoir protecteur des vaccins A, B et C

Il a été démontré que la vaccination par les vaccins antirabiques préparés sur culture cellulaire procure une bonne réponse immunitaire rapide et hautement protectrice, basée essentiellement sur l'apparition d'anticorps neutralisants dirigés contre la glycoprotéine G, dont la réponse immunitaire est potentialisée par l'implication des lymphocytes TCD4+ (Collard, 2006).

A la lumière des résultats obtenus par le test d'activité des NIH, nous pouvons estimer que tous les vaccins EBS5, quelle que soit la dose initiale utilisée (10^{-6} , $10^{-4,9}$ $10^{-4,7}$ DL_{50}), sont efficaces et peuvent entraîner une bonne réponse immunitaire. En revanche, compte tenu de la résistance des souris ayant survécu à l'inoculation d'un CVS, le pouvoir protecteur conféré par les vaccins EBS5 diffère et cela est dû à la différence de la dose initiale de ces vaccins.

Nous pouvons aussi déduire d'après nos résultats, que malgré le nombre de DL_{50} réel de CVS est le plus fort (79 DL_{50}), mais le pouvoir protecteur des trois vaccins (VA) est satisfaisant.

II.5. La dose minimale protectrice du vaccin EBS5

La mise en évidence du titre viral minimal qui entraîne une réponse immunitaire protectrice est l'un des objectifs de notre étude. Pour cela nous n'avons pas déterminé la dose limite pour laquelle ces vaccins ne sont pas efficaces ($VA < 0,3$).

Nos résultats du test des NIH indiquent que le vaccin C a une activité protectrice contre la rage, cela démontre que le titre initial $DL_{50} = 10^{-4,7}$ ne représente pas la dose limite où il n'y a pas de protection. Ce qui signifie qu'il y'a une possibilité de pousser les dilutions en plus afin d'obtenir des lots de vaccins moins dilués et confèrent une bonne protection.

Conclusion

Jusqu'à ce jour, la rage une fois déclarée est mortelle, surtout dans les pays à faible revenu où l'accès aux vaccins et sérums antirabiques (viraux-humain et vétérinaire) est difficile. La vaccination des animaux est la stratégie la plus précieuse et la plus efficace pour lutter contre la maladie, en essayant de réduire au maximum le nombre des vecteurs de transmission de cette pathologie.

L'acquisition et la production d'un vaccin vétérinaire à faible coût et abordable pour la vaccination des animaux domestiques (chien, chat) et sauvages est un sujet d'actualité dans le monde entier.

A travers nos résultats portant sur l'évaluation du pouvoir protecteur d'un vaccin antirabique inactivé par le test d'activité des NIH, nous avons constaté que les vaccins EBS5 testés sous forme de dilutions (A et C) ont des valeurs antigéniques supérieures à 0,3 mis appart le vaccin B. De ce fait, il est préférable de refaire le test afin de confirmer la logique des résultats. De plus, le calcul du pourcentage de survie des souris immunisées par les différents vaccins indique qu'il existe une variation dans le degré de protection conféré par chacun d'entre eux.

De ce fait, nous avons conclu que les vaccins EBS5 testés sont efficaces contre le virus rabique sauf le vaccin B; pour cela nous n'avons pas défini la dose minimale qui pourra entrainer une réponse immunitaire protectrice, car le vaccin C qui est le plus dilué a pu conférer la bonne réponse immunitaire. En revanche, le pourcentage de protection calculé indique qu'il y'a une relation étroite entre le titre viral et le degré de protection étant donné que les vaccins qui se manifestent par un titre élevé confèrent une protection importante.

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus s'avèrent encourageants, même si les données de ces tests ne sont pas définitives. La répétabilité des tests plusieurs fois est recommandée pour la confirmation de nos résultats, afin de se rapprocher du seuil minimal du titre viral du vaccin EBS5 dans le but de rentabiliser la production d'un vaccin antirabique à virus inactivé à faible coût pour une vaccination animale efficace. Il est également indispensable de réaliser des tests des NIH qui auront pour but d'identifier le seuil maximal de particules virales qui n'entrainera pas une tolérance immunitaire.

Références bibliographiques

- Abebe, M., Yongkwan, W., Birhanu, H., Ju Hun K., Hailu, L., Su Jin L., Choong-Soon, Y., Hokyoung, J., Seong Cheol M. and O. Soo L. (2006). NIH Potency Test for Rv-Fc and Rv-K Based Candidate Anti-Rabies Vaccine Produced at Komipharm International Co., Ltd. Korea. *J. Vaccines Vaccin*, 7 :4.
- Albertini, A., (2006). Etude structurale de la nucléoprotéine de virus de la rage. Thèse de Doctorat. Biologie structurale et Nanobiologie. Université de Joseph Fourier-Grenoble I.
- Andral, I., et Blancou, J. (1982). La rage. Nouveaux développements en matière de vaccination. *Rev sci tech Off int. Epiz*, 1(4): 895-930.
- Angot, Jean-Luc. (2004). L'organisation mondial de la santé animale (OIE) : normes sanitaires et commerce international. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.
- Aubry, P. et Rotivel, Y. (2001). Rage. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris). Maladies infectieuses*, 8-065-C-10, 16p.
- Banerjee, A. K. (1987). Transcription and réplication of *Rhabdoviruses*. *Microbiol Rev*, 51, 66-87.
- Blancou, J. (1985). Les vaccins et la vaccination antirabique des animaux domestiques et sauvages en Europe. *Revs citech Off int Epiz*, 4(2): 235-247.
- Blancou, J. Milward P., Toma B., et Willemart J. P. (1981). La vaccination antirabique de carnivores sous corticothérapie. *Rec. Méd. Vét.*, 157(9): 651-657.
- Blin, A. (2018). Principe de la vaccination. *Actualités Pharmaceutiques*, 57(580): 47-49. doi: 10.1016/j.actpha.2018.09.011.
- Cliff, A., Smallman-Raynor, M. (2013). *Oxford Textbook of Infectious Disease Control: A Geographical Analysis from Medieval Quarantine to Global Eradication*, OUP Oxford, 124P.
- Collard, L. (2006). Apport de la biologie moléculaire à la taxinomie et à l'épidémiologie des virus rabiques. Thèse de Doctorat : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. 186p.
- Dacheux, L., et Bourhy, H. (2011). Le diagnostic de la rage. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 430 : 33-40. Doi :10.1016/s1773-035x (11)70823-1.
- Dacheux, L., Peigue-Lafeuille, H., et Bourhy, H. (2009). *Virus de la rage*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Biologie clinique, 90-55-0165.

- **Del Valle, J. (2000).** Construction antirabique au chu de Nancy. Evaluation et proposition des pratiques médicale. Thèse du docteur en médecine. Université Henri Nancy I. France.
- **Delmas, O., Holmes, EC., Talbi, C., Larrous, F., Dacheux, L. (2008).** Genomic Diversity and Evolution of the *Lyssaviruses*. PLoS ONE 3(4): e2057. Doi : 10.1371/journal. One.0002057.
- **Fernandez, Peter J., et White, William, R. (2012).** Atlas des maladies animales transfrontalières. OIE.
- Guide Canadien d’immunisation, 2006. Septième édition 20-431.
- **Hemachudha, T., wacharapluesadee, S., mitrabhakdi, E., wilde, H., morimoto, K., & lewis, R. A. (2005).** Pathophysiology of human paralytic rabies. Journal of Neurovirology, 11: 93-100.
- **Imbert, P., Guérin, N., Sorge, F. (2008).** Enfants voyageurs se rendant sous les tropiques : les vaccins négligés. Med Trop, 68: 231-235.
- **Jackson, A. C. (2007).** Human diseases. In: Jackson A. C., Wunner A. H. (eds.) Rabies, 2nd ed. London, Elsevier Academic Press, pp. 309-340.
- **Kaplan, M., et Kaprowski, H. (1974).** La rage technique de laboratoire. 3ème éd. Genève: Word Heath Organisation.
- **Mangué, J. (2009).** Epidémiologie de la rage et aspects moléculaires du virus rabique à Bangui au cours de la période de 2006 à 2008. Thèse de Docteur en médecine vétérinaire. Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal.
- **Mfupa Tchana, Y. (2014).** A propos de la rage humaine au service des maladies infectieuses du CHU du point G de Bamako.
- **Odile, L. (2007).** Classification des vaccins, mode de préparation (OMS).
- **Peigue-Lafeuille, H., Bourhy, H., Abiteboul, D. et Floret D, et al (2004).** La rage humaine en France en 2004 : état des lieux et conduite à tenir. Médecine et Maladies infectieuses, vol. p. 551-560.
- **Pilly, E. (2013).** Préparation ECN- Item 213- CMIT.
- **Pommier, F. (2009).** « Le mot vaccin », sur France Inter.fr, 27 novembre 2009.
- **Reculard, P. (1999).** Vaccins préparés en culture cellulaire, usage vétérinaire. In La rage : techniques de laboratoire, 4^{ème} ed. Genève : OMS. 320-330.
- **Ribadeau-Dumas, F., Dacheux, L., et Bourhy, H. (2013).** La rage. Médecine/sciences, 29(1): 47–55. doi :10.1051/medsci/2013291013.

- **Soulebot, P. (1980).** Prophylaxie médicale de la rage vétérinaire. Bull. soc. Sci. Vét. Méd. Comp. 82(1): 93-47.
- **Thevenot C. (2003).** L'Entente Interdépartementale de lutte contre la rage et les autres zoonoses : son histoire, ses actions, thèse Mèd. Vét., alfort, 147 p.
- **Toma, B. (2006).** La rage. Ecoles nationales vétérinaires françaises, maladies contagieuses. 73P.
- **WHO. (1980).** Report of consultation on rabies. Prevention and control. W.H.O. Lyon, France, 10-12 March 1980, 43p.
- **Zeżima, D. (2010).** Lutte contre la rage canine mise en place d'un plan de vaccination antirabique en Mongolie. Thèse de Doctorat : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfortl.108p.

Annexe 1

❖ Résultats du test de stérilité





INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Service des vaccins et sérum antirabiques

Contrôle de la virulence

Test N° 27,

Lot vaccin N° : EBS5 du 03.12.2019

Date d'inoculation : 03.03.2020

Souche virale : ERA

Dilution : $10^{-3} \rightarrow 10^{-7}$

Volume 0,02 ml / 0,03 ml voie I/C

Facteur de dilution : 10

Nombre de souris par dilution (n) : 6 : 10 : X 20 :

Préparateur : Doukhanja, A.

Stagiaires : Achit Latifa
Sabraoui Siham.

DILUTION	Morts	Survivants	ÉRAPE DU CALCUL
10^{-3}	10	0	
10^{-4}	10	0	
10^{-5}	10	0	
10^{-6}	5	5	
10^{-7}	3	7	

DL₅₀ = $10^{-6,3}$

JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
DATE											DATE																	
10^{-3}											10^{-6}																	
1	/	/	/	/	P	+					1	/	/	/	/	/	P	+										
2	/	/	/	/	P	+					2	/	/	/	/	/	/	P	+									
3	/	/	/	/	P	+					3	/	/	/	/	/	/	P	+									
4	/	/	/	/	P	+					4	/	/	/	/	/	/	/	+									
5	/	/	/	/	P	+					5	/	/	/	/	/	/	/	P	+								
6	/	/	/	/	P	+					6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
7	/	/	/	/	P	+					7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
8	/	/	/	/	P	+					8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
9	/	/	/	/	P	+					9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
10	/	/	/	/	P	+					10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
10^{-9}											10^{-7}																	
1	/	/	/	/	P	+					1	/	/	/	/	/	P	+										
2	/	/	/	/	P	+					2	/	/	/	/	/	/	+										
3	/	/	/	/	P	+					3	/	/	/	/	/	/	P	+									
4	/	/	/	/	P	+					4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
5	/	/	/	/	+						5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
6	/	/	/	/	+						6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
7	/	/	/	/	+						7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
8	/	/	/	/	+						8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
9	/	/	/	/	+						9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
10	/	/	/	/	+						10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
10^{-5}																												
1	/	/	/	/	P	+					1																	
2	/	/	/	/	P	+					2																	
3	/	/	/	/	P	+					3																	
4	/	/	/	/	P	+					4																	
5	/	/	/	/	P	+					5																	
6	/	/	/	/	P	+					6																	
7	/	/	/	/	P	P	+				7																	
8	/	/	/	/	P	P	+				8																	
9	/	/	/	/	P	P	+				9																	
10	/	/	/	/	P	P	P	+			10																	

/: Survivant

P: Paralytic

+: Mort

D: Dévoté



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Service des vaccins et sérum antirabiques

Contrôle de la virulence

Test N° 33

Lot vaccin N° : Vaccin A Avant BPL

Date d'inoculation : 15-03-2020

Souche virale : _____

Dilution : 10^{-4} - 10^{-7}

Volume 0,02 ml / 0,03 ml _____ voie I/C

Facteur de dilution : 10

Nombre de souris par dilution (n) : 6 : _____ 10 : 20 : _____

Préparateur : Boukhomjra A

Stagiaires : Achit hotifa
Sahraoui Sihem

DILUTION	Morts	Survivants	ÉRAPE DU CALCUL
10^{-4}	8	0	
10^{-5}	7	0	
10^{-6}	10	0	
10^{-7}	0	8	
/			

DL 50 = 10^{-6}

JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
DATE																		DATE																	
10^{-4}										10^{-7}																									
1	/	/	/	/	A												1	/	/	/	/	D													
2	/	/	/	/	D												2	/	/	/	/	D													
3	/	/	/	/	/	P	+										3	/	/	/	/	/													
4	/	/	/	/	/	P	+										4	/	/	/	/	/													
5	/	/	/	/	/	P	+										5	/	/	/	/	/													
6	/	/	/	/	/	+	+										6	/	/	/	/	/													
7	/	/	/	/	/	+	+										7	/	/	/	/	/													
8	/	/	/	/	/	+	+										8	/	/	/	/	/													
9	/	/	/	/	/	+	+										9	/	/	/	/	/													
10	/	/	/	/	/	+	+										10	/	/	/	/	/													
10^{-5}																																			
1	/	/	/	/	/	D											1																		
2	/	/	/	/	/	D											2																		
3	/	/	/	/	/	D											3																		
4	/	/	/	/	/	P	+										4																		
5	/	/	/	/	/	P	+										5																		
6	/	/	/	/	/	P	+										6																		
7	/	/	/	/	/	P	+										7																		
8	/	/	/	/	/	P	+										8																		
9	/	/	/	/	/	P	+										9																		
10	/	/	/	/	/	P	+										10																		
10^{-6}																																			
1	/	/	/	/	/	+											1																		
2	/	/	/	/	/	+											2																		
3	/	/	/	/	/	+											3																		
4	/	/	/	/	/	+											4																		
5	/	/	/	/	/	+											5																		
6	/	/	/	/	/	+											6																		
7	/	/	/	/	/	P	+										7																		
8	/	/	/	/	/	P	+										8																		
9	/	/	/	/	/	P	+										9																		
10	/	/	/	/	/	P	+										10																		

/ ; Survivant P ; Paralysée + ; Mort D ; Dévoté



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Service des vaccins et sérum antirabiques

Contrôle de la virulence

Test N° 34

Lot vaccin N° : VACCIN B Avant BPL

Date d'inoculation : 15.03.2020

Souche virale : ERA du 03.12.2013

Dilution : $10^{-4} \rightarrow 10^{-7}$

Volume 0,02 ml / 0,03 ml voie I/C

Facteur de dilution : 10

Nombre de souris par dilution (n) : 6 : 10 : 20 :

Préparateur : Boukhomfra. A

Stagiaires : Achut hatifa

Sahraoui Siham.

DILUTION	Morts	Survivants	ÉRAPE DU CALCUL
10^{-4}	10	0	
10^{-5}	4	6	
10^{-6}	0	9	
10^{-7}	0	0	
/	/	/	

$DL_{50} = 10^{-4.9}$

JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
DATE											DATE											
10^{-4}											10^{-7}											
1	/	/	/	/	/	+					1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
2	/	/	/	/	/	+					2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
3	/	/	/	/	/	P	P	+			3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
4	/	/	/	/	/	P	P	+			4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
5	/	/	/	/	/	P	P	+			5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
6	/	/	/	/	/	P	P	+			6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
7	/	/	/	/	/	/	P	+			7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
8	/	/	/	/	/	/	P	+			8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
9	/	/	/	/	/	/	P	+			9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
10	/	/	/	/	/	/	P	+			10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
10^{-5}																						
1	/	/	/	/	/	P	P	+			1											
2	/	/	/	/	/	P	P	+			2											
3	/	/	/	/	/	P	P	+			3											
4	/	/	/	/	/	/	P	+			4											
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5											
6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6											
7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7											
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8											
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	9											
10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10											
10^{-6}																						
1	/	/	/	/	/	/	D				1											
2	/	/	/	/	/	/	/	/			2											
3	/	/	/	/	/	/	/	/			3											
4	/	/	/	/	/	/	/	/			4											
5	/	/	/	/	/	/	/	/			5											
6	/	/	/	/	/	/	/	/			6											
7	/	/	/	/	/	/	/	/			7											
8	/	/	/	/	/	/	/	/			8											
9	/	/	/	/	/	/	/	/			9											
10	/	/	/	/	/	/	/	/			10											

/ : Survivant P : Paralysée + : Mort D : Dévoré



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Service des vaccins et sérum antirabiques

Contrôle de la virulence

Test N° 35

Lot vaccin N° : Vaccin C Avant BPL

Date d'inoculation : 15.03.2020

Souche virale : _____

Dilution : 10^{-4} - 10^{-7}

Volume 0,02 ml X / 0,03 ml _____ voie I/C X

Facteur de dilution : 10

Nombre de souris par dilution (n) : 6 : 10 : X 20 : _____

Préparateur : Boukhoufrou A.
- Sabagiane: Achi Hartifa
Sahroun Sihem

DILUTION	Morts	Survivants	ÉRAPE DU CALCUL
10^{-4}	8	0	
10^{-5}	4	4	
10^{-6}	0	10	
10^{-7}	0	10	$DL_{50} = 10^{-4,7}$
/	/	/	

JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
DATE																		DATE																	

10^{-4}																10^{-7}																	
1	/	/	/	/	/	/	/	D									1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
2	/	/	/	/	/	/	/	D									2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
3	/	/	/	/	/	/	/	P	+								3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
4	/	/	/	/	/	/	/	P	+								4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
5	/	/	/	/	/	/	/	P	+								5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
6	/	/	/	/	/	/	/	P	+								6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
7	/	/	/	/	/	/	/	P	+								7																
8	/	/	/	/	/	/	/	P	D	+							8																
9	/	/	/	/	/	/	/	P	D	+							9																
10	/	/	/	/	/	/	/	P	D	+							10																

10^{-5}																																	
1	/	/	/	/	/	/	/	D									1																
2	/	/	/	/	/	/	/	D									2																
3	/	/	/	/	/	/	/	/	/								3																
4	/	/	/	/	/	/	/	/	/								4																
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/								5																
6	/	/	/	/	/	/	/	/	/								6																
7	/	/	/	/	/	/	/	/	/								7																
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/								8																
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/								9																
10	/	/	/	/	/	/	/	/	/								10																

10^{-6}																																	
1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1																
2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2																
3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3																
4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4																
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5																
6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6																
7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7																
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8																
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	9																
10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10																

/ : Survivant P : Paralysée + : Mort D : Dévoré

Annexe 3

❖ Détermination du titre viral selon la méthode de SPERMAN et KARBBER

1. Noter le Log₁₀ de l'inverse de la plus faible dilution du vaccin pour laquelle toutes les souris sont positives.
2. Déterminer le nombre total des souris positives à la dilution définie à la première étape 1 et à toutes les dilutions poussées.
3. Lire dans la table numérique (tableau A) correspondant au facteur de dilution et au nombre de souris utilisées, la valeur numérique attribuée au nombre de souris positives déterminée à la deuxième étape ;
4. Additionner les valeurs obtenues en 1 et en 3, ce total représente le Log₁₀ de l'inverse de la dilution au point 50%.

➤ **DL₅₀ du vaccin EBS5**

- La dilution la plus faible du virus pour laquelle toutes les souris mortes est : **10⁻³**
- Le Log₁₀ de l'inverse de la plus faible dilution est **Log10⁻³ = 3**
- Nombre totale des souris mortes est: **38**
- La valeur numérique attribuée à 38 souris mortes d'après la table est : **3,3**
- Calcule numérique : 3 + 3,3 = 6,3 (le Log de l'inverse de la dilution au point 50%)
- **DL₅₀ = 10^{-6,3}**

➤ **DL₅₀ du vaccin A**

- La dilution la plus faible du virus pour laquelle toutes les souris mortes est : **10⁻⁴**
- Le Log₁₀ de l'inverse de la plus faible dilution est **log 10⁻⁴ = 4**
- Nombre totale de souris mortes est : **25**
- La valeur numérique attribuée à 25 souris mortes d'après la table est : 2
- Calcule numérique : 4 + 2 = 6 (le Log de l'inverse de la dilution au point 50%)
- **DL₅₀ = 10⁻⁶**

➤ **DL₅₀ du vaccin B**

- La dilution la plus faible du virus pour laquelle toutes les souris mortes est : **10⁻⁴**
- Le Log₁₀ de l'inverse de la plus faible dilution est **log 10⁻⁴ = 4**
- Nombre totale de souris mortes est : **14**
- La valeur numérique attribuée à 14 souris mortes d'après la table est : 0,9
- Calcule numérique : 0,9 + 4 = 4,9 (le Log de l'inverse de la dilution au point 50%)
- **DL₅₀ = 10^{-4,9}**

➤ **DL₅₀ du vaccin C**

- La dilution la plus faible du virus pour laquelle toutes les souris mortes est : **10⁻⁴**
- Le Log10 de l'inverse de la plus faible dilution est **log 10⁻⁴ = 4**
- Nombre totale de souris mortes est : **12**
- La valeur numérique attribuée à 24 souris mortes d'après la table est : 0,7
- Calcule numérique : **0,7 + 4 = 4,7** (le log de l'inverse de la dilution au point 50%)
- **DL₅₀ = 10^{-4,7}**

TABLE 5. NUMERICAL VALUES FOR CALCULATION OF TITRES:
DILUTION FACTOR = 10

Total no. of positive animals	No. of inoculated animals per dilution				
	n = 4	n = 5	n = 6	n = 8	n = 10
4	0.50				
5	0.75	0.5			
6	1.00	0.7	0.50		
7	1.25	0.9	0.67		
8	1.50	1.1	0.83	0.50	
9	1.75	1.3	1.00	0.63	
10	2.00	1.5	1.17	0.75	0.5
11	2.25	1.7	1.33	0.88	0.6
12	2.50	1.9	1.50	1.00	0.7
13	2.75	2.1	1.67	1.13	0.8
14	3.00	2.3	1.83	1.25	0.9
15	3.25	2.5	2.00	1.33	1.0
16	3.50	2.7	2.17	1.50	1.1
17	3.75	2.9	2.33	1.63	1.2
18	4.00	3.1	2.50	1.75	1.3
19	4.25	3.3	2.67	1.88	1.4
20	4.50	3.5	2.83	2.00	1.5
21	4.75	3.7	3.00	2.13	1.6
22	5.00	3.9	3.17	2.25	1.7
23	5.25	4.1	3.33	2.38	1.8
24	5.50	4.3	3.50	2.50	1.9
25	5.75	4.5	3.67	2.63	2.0
26		4.7	3.83	2.75	2.1
27	for each further positive animal add 0.25	4.9	4.00	2.88	2.2
28		5.1	4.17	3.00	2.3
29		5.3	4.33	3.13	2.4
30		5.5	4.50	3.25	2.5
31		for each further positive animal add 0.2	4.67	3.38	2.6
32			4.83	3.50	2.7
33			5.00	3.63	2.8
34			5.17	3.75	2.9
35			5.33	3.88	3.0
36				4.00	3.1
37			for each further positive animal add 0.167	4.13	3.2
38				4.25	3.3
39				4.38	3.4
40				4.50	3.5
41				for each further positive animal add 0.125	3.6
42					3.7
43					3.8
44					3.9
45					4.0
					for each further positive animal add 0.1



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Service des vaccins et sérum antirabiques

Contrôle de la virulence

Test N° 28

Lot vaccin N° : Vaccin A Prés BPL (test de virulence ves adulte)

Date d'inoculation : 10-03-2010

Souche virale : ERA

Dilution : /

Volume 0,02 ml / 0,03 ml voie I/C

Facteur de dilution : /

Nombre de souris par dilution (n) : 6 : 10 : 20 :

Préparateur : Boukhenfou
Achik Hartifa
SA Hroui Sib

DILUTION	Morts	Survivants	ÉRAPE DU CALCUL
			<u>M.L.H.T.</u>

JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
DATE	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	DATE	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	Δ							1																		
2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2																		
3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3																		
4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4																		
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5																		
6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6																		
7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7																		
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8																		
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	9																		
10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10																		
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/																			
1																	1																		
2																	2																		
3																	3																		
4																	4																		
5																	5																		
6																	6																		
7																	7																		
8																	8																		
9																	9																		
10																	10																		

/ : suivant

Δ : Dévari



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Service des vaccins et sérum antirabiques

Contrôle de la virulence

Test N° 29

Lot vaccin N° : Vaccin B Après BPL (test de virulence résiduelle)

Date d'inoculation : 10-03-2020

Souche virale : ERA

Dilution : /

Volume 0,02 ml / 0,03 ml voie I/C

Facteur de dilution : /

Nombre de souris par dilution (n) : 6 : 10 : 20 :

Préparateur : Boukhenfra
Achit Hatifa
SA Hraoui Siben

DILUTION	Morts	Survivants	ÉRAPE DU CALCUL
			<u>NULLÉ</u>

JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
DATE	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	DATE	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	/	/	/	/	/	D											1																
2	/	/	/	/	/	D											2																
3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3																
4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4																
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5																
6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6																
7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7																
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8																
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	9																
10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10																
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/																	
1	/	/	/	/	/	D											1																
2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2																
3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3																
4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4																
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5																
6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6																
7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7																
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8																
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	9																
10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10																
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/																	

/ : arrivant D : Départ



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Service des vaccins et sérum antirabiques

Contrôle de la virulence

Test N° 30

Lot vaccin N° : Vaccin CAPES BPL (test de virulence résistante)

Date d'inoculation : 10-03-2019

Souche virale : ERA du 03-12-2018

Dilution : /

Volume 0,02 ml / 0,03 ml voie I/C

Facteur de dilution : /

Nombre de souris par dilution (n) : 6 : 10 : 20 :

Préparateur : Boukhalfa
Adnane Hartifa
SAHROU Siba

DILUTION	Morts	Survivants	ÉRAPE DU CALCUL

Handwritten red text: 24/2/19

JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16			
DATE	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	DATE	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25			
1	/	/	/	/	/	D											1																			
2	/	/	/	/	/	D											2																			
3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3																			
4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4																			
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5																			
6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6																			
7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7																			
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8																			
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	9																			
10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10																			
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/																				
1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1																			
2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2																			
3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3																			
4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4																			
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5																			
6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6																			
7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7																			
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8																			
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	9																			
10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10																			
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/																				
1																	1																			
2																	2																			
3																	3																			
4																	4																			
5																	5																			
6																	6																			
7																	7																			
8																	8																			
9																	9																			
10																	10																			

/ : absent

D : Dévotion

TEST N. I. H

Lot vaccin N° : **VACC A**

Dates de vaccinations :

Voie : I/P

1. **07.09.2020**
2. **14.09.2020**

Volume du vaccin : 0.5ml

Dilutions : Facteur 5

Date de l'épreuve : **21.09.2020**

Virus d'épreuve CVS/ IPA

Dilution de virus d'épreuve : $10^{-5.8}$ Nombre de : DL 50 théoriques DL 50 réelles **79 DL50**

Dilution	M	S	Etapes du Calcul
1/5 Pur	1 1	7 7	1
1/25 1/5	4 4	6 6	2
1/125 1/25	7 7	3 3	3
1/625 1/125	8 8	0 0	4
1/3125 1/625	8 8	1 1	

DE50 en valeur absolue : **1.8**

DE50 ramenée au poids de M C :

VA : **1.28**

TEST N . I . H

Lot vaccin N° : **NAC B**

Dates de vaccinations :

1. **07.09.2020**
2. **11.09.2020**

Voie : I/P

Volume du vaccin : 0.5ml

Dilutions : Facteur 5

Date de l'épreuve : **21.09.2020**

Virus d'épreuve CVS/ IPA

Dilution de virus d'épreuve : $10^{-3.9}$

Nombre de : DL 50 théoriques **12.508** DL 50 réelles **7.9 DL50**

Dilution	M	S	Etapas du Calcul
1/5 1/5 Pur	2	6	1
1/25 1/5	5	3	2
1/125 1/25	8	0	3
1/625 1/125	8	0	4
1/3125 1/625	8	0	

DE50 en valeur absolue : **0.9**

DE50 ramenée au poids de M C :

VA : **0.16**

TEST N. I. H

Lot vaccin N° : **VAC.....C**

Dates de vaccinations :

1. **. 07. 09. 2020**
2. **. 14. 09. 2020**

Voie : I/P

Volume du vaccin : 0.5ml

Dilutions : Facteur 5

Date de l'épreuve : **21. 09. 2020**

Virus d'épreuve CVS/ IPA

Dilution de virus d'épreuve : $10^{-3.9}$

Nombre de : DL 50 théoriques **10^{-5.8}** DL 50 réelles **79 DL50**

Dilution	M	S	Etapas du Calcul
1/5 Pur	0	7	1
1/25 1/5	5	3	2
1/125 1/25	6	2	3
1/625 1/125	9	0	4
1/3125 1/625	10	0	

DE50 en valeur absolue : **2**

DE50 ramenée au poids de M C :

VA : **2.02**

TEST N . I . H

Lot vaccin N° : VAC..... REF

Dates de vaccinations :

1. 07.09.2020
2. 17.09.2020

Voie : I/P

Volume du vaccin : 0.5ml

Dilutions : Facteur 5

Date de l'épreuve : 21.09.2020

Virus d'épreuve CVS/ IPA

Dilution de virus d'épreuve : $10^{-5.90}$ $10^{-3.9}$

Nombre de : DL 50 théoriques $10^{-5.8}$ DL 50 réelles 79 DL₅₀

Dilution	M	S	Etapas du Calcul
1/5	1	8	1
1/25	5	4	2
1/125	5	3	3
1/625	8	1	4
1/3125	9	0	

DE50 en valeur absolue : 1.96

DE50 ramenée au/poids de M C :

VA : 1.86

jour	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Jour	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Date	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6	7	Date	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6	7

1/5

1/625

1	/	/	/	/	/	P+												1	/	/	/	/	/	/	+										
2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2	/	/	/	/	/	/	+										
3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3	/	/	/	/	/	/	+										
4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4	/	/	/	/	/	/	/	P+									
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5	/	/	/	/	/	/	/	P+									
6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6	/	/	/	/	/	/	/	P+									
7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7	/	/	/	/	/	/	/	P+									
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8	/	/	/	/	/	/	/	P+									
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
10																		10																	

1/25

1/3125

1	/	/	/	*														1	/	/	/	/	/	/	+										
2	/	/	/	/	/	+												2	/	/	/	/	/	/	+										
3	/	/	/	/	/	/	P+											3	/	/	/	/	/	/	P	P+									
4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	P+						4	/	/	/	/	/	/	/	P+									
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	P					5	/	/	/	/	/	/	/	P+									
6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6	/	/	/	/	/	/	/	P+									
7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7	/	/	/	/	/	/	/	P+									
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8	/	/	/	/	/	/	/	P+									
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	9	/	/	/	/	/	/	/	P+									
10																		10																	

1/125

1	/	/	/	/	/	PP+												1																	
2	/	/	/	/	/	/	P+											2																	
3	/	/	/	/	/	/	/	P+										3																	
4	/	/	/	/	/	/	/	/	P+									4																	
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	P+								5																	
6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	6																	
7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7																	
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8																	
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	9																	
10																		10																	

/ : survivant

P : paralysie

+ : mort



INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Service des vaccins et sérum antirabiques

Contrôle de la virulence

Test N° TEMOINS: NIH: VAC (A. B. C)

Lot vaccin N° : CVS

Date d'inoculation : 21.09.2020

Souche virale : _____

Dilution : $10^{-3,9}$ - $10^{-5,9}$

Volume 0,02 ml / 0,03 ml voie I/C

Facteur de dilution :

Nombre de souris par dilution (n) : 6 : 10 : 20 :

Préparateur : Boulahlib. M

Stagiaires : Achit Hafifa
Sahrouni Sihem.

DILUTION	Morts	Survivants	ÉRAPE DU CALCUL
$10^{-3,9}$	10	0	
$10^{-4,9}$	10	0	
$10^{-5,9}$	4	6	
/	/	/	DL ₅₀ = 10 ^{-5,8}
/	/	/	

JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	JOUR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
DATE																		DATE																
No-3.90																																		
1	/+																1																	
2	/	/	/	+													2																	
3	/	/	/	/	/	/	/	P	P	+							3																	
4	/	/	/	/	/	/	/	P	+								4																	
5	/	/	/	/	/	/	/	P	+								5																	
6	/	/	/	/	/	/	/	P	+								6																	
7	/	/	/	/	/	/	/	P	+								7																	
8	/	/	/	/	/	/	/	P	+								8																	
9	/	/	/	/	/	/	/	P	+								9																	
10	/	/	/	/	/	/	/	P	+								10																	
No-4.90																																		
1	/+																1																	
2	/	/	/	+													2																	
3	/	/	/	/	/	/	+										3																	
4	/	/	/	/	/	/	/	P	+								4																	
5	/	/	/	/	/	/	/	P	+	+							5																	
6	/	/	/	/	/	/	/	P	+	+							6																	
7	/	/	/	/	/	/	/	P	+	+							7																	
8	/	/	/	/	/	/	/	P	+	+							8																	
9	/	/	/	/	/	/	/	P	+	+							9																	
10	/	/	/	/	/	/	/	P	+								10																	
No-5.90																																		
1	/	/	/	/	/	/	+										1																	
2	/	/	/	/	/	/	/	P	+								2																	
3	/	/	/	/	/	/	/	P	P	+							3																	
4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	P	+						4																	
5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	P						5																	
6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/						6																	
7	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/						7																	
8	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/						8																	
9	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/						9																	
10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/						10																	

/: survivant

P: paralysie

+: mort.

Annexe 6

- **Calcul de la dose efficace 50 des vaccins A, B et C et le vaccin de référence**

Pour le calcul des dilutions donnant la dose efficace médiane (DE_{50}), par la méthode de REED & MUENCH

Etape 01: (dilution de départ) : on part de la dilution à la quelle on observe une mortalité légèrement inférieure à 50%.

Etape 02: (différence des logarithmes) : on utilise la formule donnée si dessous pour déterminer la différence entre le logarithme du point de départ et le logarithme du point 50%.

La formule : $(50\% - \text{mortalité immédiatement inférieure à } 50\%) / (\text{mortalité immédiatement supérieur à } 50\% - \text{mortalité immédiatement inférieur à } 50\%) * \text{logarithme du facteur de dilution.}$

Etape 3: Calcul du Log (inverse de la dilution du point 50) qui est égale : la soustraction de différence des logarithmes de Log inverse de la dilution de départ.

Etape 4: Calcul de la dilution correspondant au point 50% (titre DL50) qui est égale à l'inverse de Log de la valeur déterminée dans l'étape 3.

- **DE50 du vaccin A**

Dilution du virus	Souris		Totaux cumulatifs		Pourcentage de survie %
	Survivantes	Mort	Survivantes	Mort	
Pur	7	1	17	1	94,44
1/5	6	4	10	5	66,66
1/25	3	7	4	12	25
1/125	0	8	1	20	4,76
1/625	1	8	1	28	3,44

Les totaux sont cumulés de 1/625 à pur pour les survivantes et de pur à 1/625 pour les souris dont la mort est attribuée à la rage.

1. Le facteur de dilution est 5 et la dilution de départ est **1/25**
2. « Différence des logarithmes » = $(50 - 25) / (66,66 - 25) * 0,69 = 0,41$
3. Log inverse de la dilution du point 50 = $\text{Log } 1/25 - (0,41) = 1,8$

$$DE_{50} = 1,8$$

- **DE50 du vaccin B**

Dilution du virus	Souris		Totaux cumulatifs		Pourcentage de survie %
	Survivantes	Mort	Survivantes	Mort	
Pur	6	2	9	2	81,81
1/5	3	5	3	7	30
1/25	0	8	0	13	0
1/125	0	8	0	21	0
1/625	0	8	0	29	0

1. Le facteur de dilution est 5 et la dilution de départ est **1/5**
2. « Différence des logarithmes » = $(50 - 30) / (81,81 - 30) * 0,69 = 0,26$
3. Log inverse de la dilution du point 50 = $\log 1/5 - (0,26) = 0,9$

$$\mathbf{DE_{50} = 0,9}$$

- **DE50 du vaccin C**

Dilution du virus	Souris		Totaux cumulatifs		Pourcentage de survie %
	Survivantes	Mort	Survivantes	Mort	
Pur	7	0	12	0	100
1/5	3	5	5	5	50
1/25	2	6	2	11	15,38
1/125	0	9	0	20	0
1/625	0	10	0	30	0

1. Le facteur de dilution est 5 et la dilution de départ est **1/25**
2. « Différence des logarithmes » = $(50 - 15,38) / (50 - 15,38) * 0,69 = 0,69$
3. Log inverse de la dilution du point 50 = $\text{Log } 1/25 - (0,69) = 2$

$$\mathbf{DE_{50} = 2}$$

- **DE₅₀ du vaccin de référence**

Dilution du virus	Souris		Totaux cumulatifs		Pourcentage de survie %
	Survivantes	Mort	Survivantes	Mort	
1/5	10	0	26	0	100
1/25	8	1	16	1	94,11
1/125	4	5	8	6	57,14
1/625	3	5	4	11	26,66
1/3125	1	8	1	19	5

1. Le facteur de dilution est 5 et la dilution de départ est **1/125**
2. « Différence des logarithmes » = $(50 - 57,14) / (94,11 - 57,14) * 0,69 = - 0,13$
3. Log inverse de la dilution du point 50 = $\text{Log } 1/125 - (- 0,13) = 1,96$

$$\mathbf{DE_{50} = 1,96}$$

Annexe 7**Calcul des valeurs antigéniques des vaccins « A », « B », « C », et le vaccin de référence****• Valeur antigénique du vaccin A**

- ✓ DE_{50} (vaccin expertisé) – DE_{50} (vaccin de référence) = X : $1,8 - 1,96 = -0,16$
- ✓ $\text{Anti Log } X = Y$: $\text{Anti Log } (-0,16) = 0,69$
- ✓ VA (expertisée) = Y * VA (référence) : $0,69 * 1,86$

$$VA \text{ (expertisée)} = 1,28$$

• Valeur antigénique du vaccin B

- ✓ DE_{50} (vaccin expertisé) – DE_{50} (vaccin de référence) = X : $0,9 - 1,96 = -1,06$
- ✓ $\text{Anti Log } X = Y$: $\text{Anti Log } (-1,06) = 0,08$
- ✓ VA (expertisée) = Y * VA (référence) : $0,08 * 1,86 = 0,16$

$$VA \text{ (expertisée)} = 0,16$$

• Valeur antigénique du vaccin C

- ✓ DE_{50} (vaccin expertisé) – DE_{50} (vaccin de référence) = X : $2 - 1,96 = 0,04$
- ✓ $\text{Anti Log } X = Y$: $\text{Anti Log } (0,04) = 1,09$
- ✓ VA (expertisée) = Y * VA (référence) : $1,09 * 1,86 = 2,02$

$$VA \text{ (expertisée)} = 2,02$$

Annexe 8

- **Calcul de la DL₅₀ du virus d'épreuve CVS**

La DL₅₀ du virus d'épreuve CVS est calculée selon la méthode de SPERMAN & KARBBER

- **Dose létale 50 (DL₅₀) du virus d'épreuve CVS**

- La dilution la plus faible du virus pour laquelle toutes les souris mortes est : **10^{-3,9}**
- Le Log10 de l'inverse de la plus faible dilution est $\log 10^{-3,9} = 3,9$
- Nombre totale de souris mortes est : **24**
- La valeur numérique attribuée à 24 souris mortes d'après la table est : **1,9**
- Calcule numérique : $3,9 + 1,9 = 5,8$ (le Log de l'inverse de la dilution point 50%)
- **DL₅₀ = 10^{-5,8}**

Le titre viral est l'inverse de DL₅₀: le titre viral = 10^{-5,8} DL₅₀

- **DL₅₀ réel du virus d'épreuve CVS**

Log inverse de la DL₅₀ du CVS – Log inverse de la dilution d'épreuve = $5,8 - 3,9 = 1,9$
Anti Log 1,9 = 79,43 donc DL₅₀ réel du CVS est **79 DL₅₀**