

1057



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**Université BLIDA1**  
**INSTITUT des SCIENCES VETERINAIRES**

Projet de fin d'étude

Pour l'obtention de :

**Diplôme de docteur vétérinaire**

**Effet d'un nouveau adjuvant polysaccharidique sur la valeur antigénique  
d'un vaccin antirabique tissulaire en utilisant le test des National Institute  
Of Health (NIH)**

Présenté par:

**KERBAL Besma**

Membres du jury :

Président :	Pr. BERBER A.	Pr.	ISV Blida 1
Promoteur:	Mr. BOUKHENFRA A.	A.E	IPA
Co-promoteur:	Dr. AKKOU M.	M.A.B	ISV Blida 1
Examineur :	Dr. HADDOUM R.	M.A.B	ISV Blida 1

## ***Remerciements***

*Au terme de ce travail, il nous est agréable d'exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

*Mes sincères remerciements*

*Au Pr. **BERBER A.** qui nous a fait l'honneur de présider le jury de notre travail.*

*A M<sup>elle</sup> **HADDOUM R.** qui a gentiment accepté de juger ce modeste travail*

*Je tiens à remercier mon encadreur **Mr. BENKHENFRA A.** pour sa patience, sa confiance, ses remarques et ses conseils.*

*Mes sincères remerciements à mon co-encadreur **Mr. AKKOU M.** pour m'avoir si bien dirigé tout au long de ce travail, j'étais impressionné par sa simplicité, sa modestie et son humanisme.*

*Aux personnels du service rage de l'Institut Pasteur d'Algérie de Kouba*

*Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance*

*A mes enseignants de l'Institut des Sciences Vétérinaire de Blida qui m'ont formés tout au long mon cycle de graduation*

***Un Grand Merci***

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à la flamme de souvenir de mon Père que Dieu ait son âme. L'Homme qui m'a appris que la vie est un pari et que chaque être doit le gagner avec son travail, son savoir et aussi son courage a toi mon Père avec tous mes beaux souvenirs*

*A ma Mère pour ses sacrifices en témoignage de tout son affection au long de mes études, que Dieu la garde et la protège*

*A mon mari qui m'a encouragé pour finir ce projet*

*A mon cher frère et ma chère frangine, mes beaux parents, ma belle sœur, mes nièces et toute ma famille*

*A mes cousins et cousines*

*A tous mes amis et collègues*

*A mes encadreurs et mes examinateurs*

**KERBAL BESMA**

## **Résumé**

Notre objectif est d'évaluer l'effet d'un adjuvant polysaccharidique sur la valeur antigénique d'un vaccin rabique tissulaire. Quatre cents souris réparties en 8 lots, dont 4 lots de 50 souris chacun étaient inoculés par un vaccin rabique non adjuvé, 4 lots par un vaccin rabique adjuvé. De plus, 50 souris ont été inoculées par un vaccin de référence et 30 souris témoins négatifs. Le contrôle de la qualité des vaccins est effectué par le test NIH qui consiste à immuniser des souris avec des concentrations variable de deux vaccins (adjuvé et non adjuvé) à J0 et J7, puis les soumettre à une épreuve virulente avec la souche virale d'épreuve (CVS) à J14. Le suivi des souris après challenge pendant 16 jours a révélé 100% de mortalité à la dilution 1/125 chez les souris vaccinées par la souche référence. Les souris vaccinées par le vaccin à virus inactivé lyophilisé non adjuvé ont dévoilé 100 % mortalité à la dilution 1/3125. Par contre les souris vaccinées par le vaccin à virus inactivé lyophilisé avec adjuvant polysaccharidique n'ont pas montrées un taux de mortalité de 100%. L'efficacité vaccinal est démontrée pour le deux types de vaccin ( $VA > 0.3$ ) avec une supériorité avérée pour les vaccins adjuvés.

**Mots clés :** Vaccin antirabique, adjuvant polysaccharidique, test NIH, valeur antigénique, souris.

## **Abstract**

Our aim is to assess the effect of a polysaccharidic additive on the antigenic value of a tissular rabic vaccine. Four hundred mice divided into 8 batches, whose 4 batches of 50 mice each one were inoculated by a rabic vaccine without additive, 4 batches by rabic vaccine mixed to a polysaccharidic additive. Moreover, 50 mice were inoculated by a vaccine of reference and 30 as negative control. The quality control of vaccines is carried out by NIH test which consists in immunizing mice with different concentrations of two vaccines within J0 and J7, then to subject them to a virulent test with a viral strain of testing at J14. After challenge, the follow-up of mice during 16 days revealed 100% of mortality to dilution 1/125 in mice vaccinated by reference stock. The mice vaccinated by the vaccine with freeze-dried inactivated virus without additive revealed 100 % mortality within dilution 1/3125. On the other hand mice vaccinated by vaccine with inactivated virus freeze-dried with polysaccharidic additive did not show a 100% rate of death. The effectiveness vaccine is shown for the two types of vaccine ( $AV > 0.3$ ) with a proven superiority for vaccines associated to polysaccharidic additive.

**Keywords:** rabic vaccine, polysaccharidic additive, NIH test, antigenic value, mice

## ملخص

هدفنا هو تقييم تأثير المواد المساعدة السكرية على قيمة المستضدات للقاح داء الكلب النسيجي . أربعمئة فأر مقسم إلى 8

عقود، 4 عقود كل عقد ب 50 فأر مع مساعد لقاح داء الكلب غير مضاف إليه مساعد و 4 عقود مضاف إليه مساعد

مع 50 فأر بلقاح المرجعية و30 فأر شواهد سلبية.

تتم مراقبة جودة اللقاحات باختبار أن إي أش الذي ينطوي على تحصين الفئران بتركيزات مختلفة بكلا اللقاحات (لقاح بمساعد و

لقاح بدون مساعد) في يوم 0 و7 . و من ثم وضعهم تحت اختبار الفيروس بالسلالة الفيروسيية سي في أسي يوم 14 .

مراقبة الفئران بعد شالنج لمدة 16 يوم أعطت لنا نتيجة 100%. وفيات في التركيز 125/1 عند الفئران بلقاح المرجعية.

الفئران الملقحين بلقاح داء الكلب غير مضاف إليه مساعد كانت نتيجة 100%. وفيات في التركيز 3125/1 . بالمقابل الفئران الملقحة

بلقاح داء الكلب المضاف إليه المساعد السكرية لم تظهر نسبة 100%. وفيات.

أثبتت فعالية التلقيح بكلا النوعين قيمة المستضدات > 0.3

( $va < 0.3$ ) مع قيمة مرتفعة بالنسبة للقاح مع المساعد .

كلمات البحث: لقاح داء الكلب، السكرية مساعد، اختباران إي أش ، قيمة المستضدات ، فأر

,

## SOMMAIRE

Introduction.....	1
-------------------	---

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

#### Chapitre 1 : Généralités sur la rage

I.1. Définition.....	2
I.2. Historique.....	2
I.3. Epidémiologie descriptive de la rage.....	3
I.3.1. Situation de la rage dans le monde.....	3
I.3.2. Situation de la rage en Algérie.....	4
I.4. Eléments de virologie concernant le virus de la rage.....	5
I.4.1. Classification.....	5
I.4.2. Structure du virus rabique.....	6
I.4.3. Cycle viral.....	9
I.4.4. Propriétés physico-chimiques du virus rabique.....	10
I.5. Pathogénie de la rage.....	11
I.5.1. Sources et mode de transmission.....	11
I.5.2. Etapes de l'infection et excrétion du virus.....	11
I.5.3. Signes cliniques.....	13
I.6. Diagnostic.....	15
I.7. Traitement.....	16
I.8. Prophylaxie .....	16
I.8.1. Prophylaxie sanitaire.....	16
I.8.2. Prophylaxie médicale.....	18

## **Chapitre 2 : Les vaccins antirabiques**

II.1. Définition de la vaccination.....	20
II.2. Définition d'un vaccin.....	20
II.3. Les différents types de vaccins.....	20
II.3.1. Les vaccins à virus modifié, non inactivés.....	21
II.3.1.2. Les vaccins réalisés à partir de la souche S.A.D. ....	21
II.3.1.3. Les caractéristiques générales des vaccins à virus modifié, non inactivés .....	21
II.3.2. Les vaccins à virus inactivé.....	21
II.3.2.1. Les vaccins dont le virus est répliqué <i>in vivo</i> .....	21
II.3.2.2. Les vaccins dont le virus est répliqué <i>in vitro</i> .....	22
II.3.2.3. Les caractéristiques générales des vaccins à virus inactivé.....	22
II.4. Le contrôle des vaccins.....	23
II.4.1. Vaccin à virus inactivé.....	23
II.4.2. Vaccin à virus modifié non inactivé.....	24
II.5. Notion d'adjuvants.....	24
II.6. Mode d'action, efficacité et toxicité des principaux adjuvants.....	25

### **PARTIE EXPERIMENTALE**

I. Problématique et objectif.....	27
I.1. Problématique.....	27
I.2. Objectifs .....	27
II. Matériels et Méthodes.....	27
II.1. Matériels biologiques .....	27
II.2. Matériels non biologiques .....	28
II.3. Méthodes.....	29
II.3.1. Conception de l'expérimentation.....	29
II.3.2. Protocole expérimental.....	29
II.3.3. Préparation des dilutions du vaccin.....	30

II.3.4. Primo et seconde vaccination (inoculation aux souris).....	32
II.3.5. Préparation des diverses dilutions du virus CVS.....	33
II.3.6. Epreuve de challenge avec le virus CVS (inoculation aux souris).....	34
II.4. Lecture des fiches cliniques.....	35
II.5. Calcul de DE <sub>50</sub> et la valeur antigénique.....	35
III. Résultats et discussion.....	36
III.1. Impact de la dilution de vaccin sur le taux de mortalité.....	36
III.2. Impact de l'adjuvant sur la dose effectrice.....	38
III.3. Valeurs antigénique et efficacité de l'adjuvant.....	39
Conclusion.....	41

## Introduction

La rage est une maladie infectieuse, virulente, inoculable généralement par morsure (Lepine et Gamet, 1969). Elle est due à un virus neurotrope du genre *Lyssavirus* de la famille des *Rhabdoviridae*, elle est transmissible à tous les mammifères y compris l'homme par inoculation ou par inhalation de particules infectieuses (WHO, 1996).

Cette zoonose est à l'origine de quelque 55 000 décès annuels dans le monde, le plus souvent suite à une infection transmise par un chien enragé (Cynthia *et al.*, 2008). La charge pour la santé publique pèse en grande partie sur l'Asie et l'Afrique avec 31 000 et 24 000 décès par an respectivement (OMS, 2013).

La prophylaxie vis-à-vis de la maladie dans ces pays d'enzootie repose sur la vaccination des populations animales. En effet, chez l'Homme la vaccination peut être préventive chez les personnes élevées d'exposition à la rage, ou curative en association avec l'administration d'immunoglobulines antirabiques humaines ou équine en cas d'exposition à un risque rabique (Toma, 2008). De plus, les animaux domestiques sont pris en charge par la vaccination préventive au vu des pertes causées par la rage.

Il a été rapporté qu'un adjuvant efficace ne doit pas seulement renforcer la réponse immunitaire, mais aussi orienter la réponse immunitaire en fonction de la pathogénèse propre à chaque infection. L'adjuvant polysaccharidique est parmi les adjuvants qui constituent un groupe de substances ayant pour but d'aider la réponse immunitaire en stimulant notamment la réponse immunitaire innée. L'adjuvant polysaccharidique permet la stimulation de l'immunité au niveau des muqueuses, en raison notamment de leur capacité de perméabiliser les muqueuses aux antigènes (Van der Lubben *et al.*, 2001)

Dans cette étude, un adjuvant polysaccharidique a été testé pour évaluer ses capacités à améliorer de la réponse vaccinale.

# **Partie bibliographique**

# **Chapitre 1 :**

## **Généralités sur la rage**

## **I. Généralités sur la rage**

### **I.1. Définition**

La rage est une maladie infectieuse, virulente, inoculable généralement par morsure (Lepine et Gamet, 1969). Elle est due à un virus neurotrope du genre *Lyssavirus* de la famille des *Rhabdoviridae*, elle est transmissible à tous les mammifères. Comme elle est transmissible à l'homme par inoculation ou par inhalation de particules infectieuses (WHO, 1996).

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

*Sur le plan histologique*, la signature de l'infection rabique est constituée par la présence d'inclusions cytoplasmiques acidophiles dans certaines cellules nerveuses : les corps de Negri. (Toma, 2006).

### **I.2. Historique**

Professeur Victor Galtier (1879) est le premier à étudier la rage au laboratoire, en utilisant le lapin comme modèle expérimental. Ses travaux sont considérables et précurseurs de ceux de Pasteur. Il a réussi à transmettre la rage au lapin à partir de la salive d'un chien enragé, injectée sous la peau mais aussi à immuniser des moutons par injection intraveineuse de matières virulentes rabiques (Rosseter, 2003)

En 1881, l'équipe de Louis Pasteur montre que le principal site 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. Ces découvertes lui permettaient, en réalisant plusieurs passages en série du virus par inoculation intracérébrale sur le lapin, d'obtenir une souche virale fixe qui après atténuation par dessiccation était utilisée en 1884 dans la mise au point d'un protocole d'immunisation sur des chiens (Steele, 1975). Pasteur l'essaya avec succès, pour la première fois, le 6 juillet 1885, sur un enfant de 9 ans, Joseph Meister, mordu 14 fois par un chien enragé et dont la mort semblait inévitable. Un an plus tard, Pasteur rapporte des résultats satisfaisants de traitements humains, réalisés après exposition, et proposa alors la création d'un centre de vaccination : l'Institut Pasteur.

Négri en 1903, qui a mis en évidence des corps d'inclusion qui portent son nom. Dans les préparations de tissus nerveux contaminés, croyait que l'agent responsable était un

microorganisme parasite de la famille des protozoaires. Pasteur parlait d'un microbe minuscule différent des bactéries ordinaires (1887) pensait que des bactéries renfermaient l'agent causal sous forme d'un corps minuscule.

Les travaux du XXème siècle ont permis des avancées importantes sur la connaissance de l'agent rabique, de sa structure et du diagnostic de la maladie.

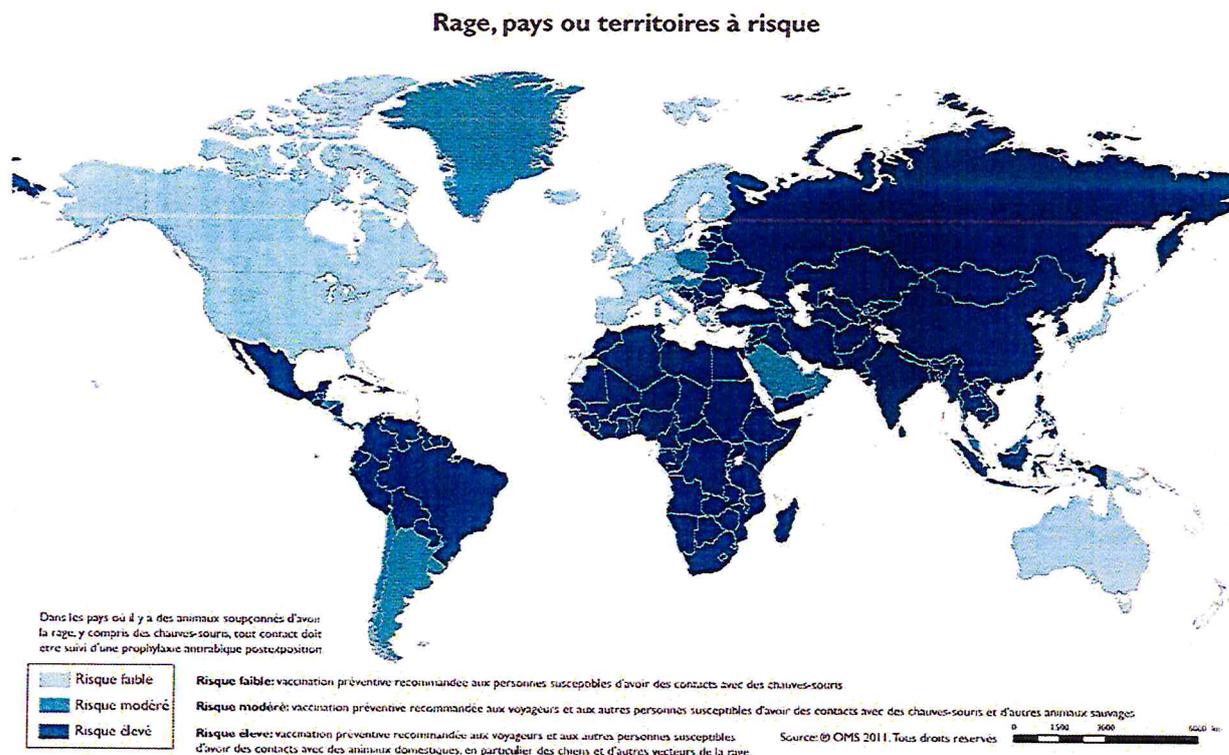
Sellers proposa, en 1927, une méthode rapide de détection des corps de Négri ; Webster et Dawson mettent au point, en 1935, un test d'inoculation sur des souris et Webster et Clow sont les premiers, en 1936, à propager le virus sur culture cellulaire (Wiktor, 1973). Il a fallu attendre les années 1960 pour que le virus soit enfin observé en microscopie électronique et 25 ans plus tard, pour que la biologie moléculaire commence à élucider la structure de son patrimoine génétique (Tordo *et al.*, 1986).

### **I.3.Epidémiologie descriptive de la rage**

#### **3.1.1. Situation de la rage dans le monde**

A l'exception de certaines îles du pacifique, de l'atlantique et au Japon, la maladie est répandue dans le monde entier et la situation est très variable en fonction de l'espace et le temps (Peigue-Lafeuille, 2006). La rage canine est prédominante en Afrique, en Asie, en Amérique latine et au Moyen-Orient. La rage canine a été par contre pratiquement éliminée en Amérique du Nord et en Europe. Dans ces pays, la maintien de la rage est lié à la faune sauvage (Cynthia *et al.*, 2008).

Chez l'Homme, la rage est à l'origine de quelque 55 000 décès annuels dans le monde, le plus souvent suite à une infection transmise par un chien enragé. Cette charge pour la santé publique pèse en grande partie sur l'Asie avec 31 000 décès par an, suivie par l'Afrique qui compte environ 24 000 décès par an (OMS, 2013).



**Figure 1: Répartition du risque de rage dans le monde (OMS, 2012)**

### I.3.2. Situation de la rage en Algérie

En Algérie, la rage constitue l'une des maladies prioritaires ; les régions du nord du pays et des hauts plateaux sont les plus exposées à la rage (**Soufi, 2008**). Seules six wilayas du Sud : Bechar, Tindouf, Adrar, Tamanrasset, Illizi et Laghouat conservent le statut sanitaire d'indemne de rage en 2008. Deux wilayas du Sud Nord Ouargla et Ghardaïa ont connu le passage du virus rabique respectivement en 2005 et 2006 (**Metallaoui, 2009**).

Si les wilayas d'extrême sud demeurent indemnes de rage c'est dû au fait de la très faible concentration de la population canine, de l'immense étendue du territoire du sud, des longues distances intercommunautaires et des conditions très difficiles pour la survie des animaux errants. Cette tendance risque de se modifier dans un avenir immédiat avec la modernisation des moyens de transport et du réseau routier et l'accroissement des populations humaines autour de grands centres urbains qui entraîneraient sans doute la prolifération des populations canine et féline (**Metallaoui, 2009**).

Au nord l'infection rabique demeure importante au niveau des wilayas du centre et de l'Est du fait de la forte prolifération de la population canine entraînée par la forte concentration de la population humaine autour des grands centres urbains et par l'urbanisation anarchique (**Metallaoui, 2009**).

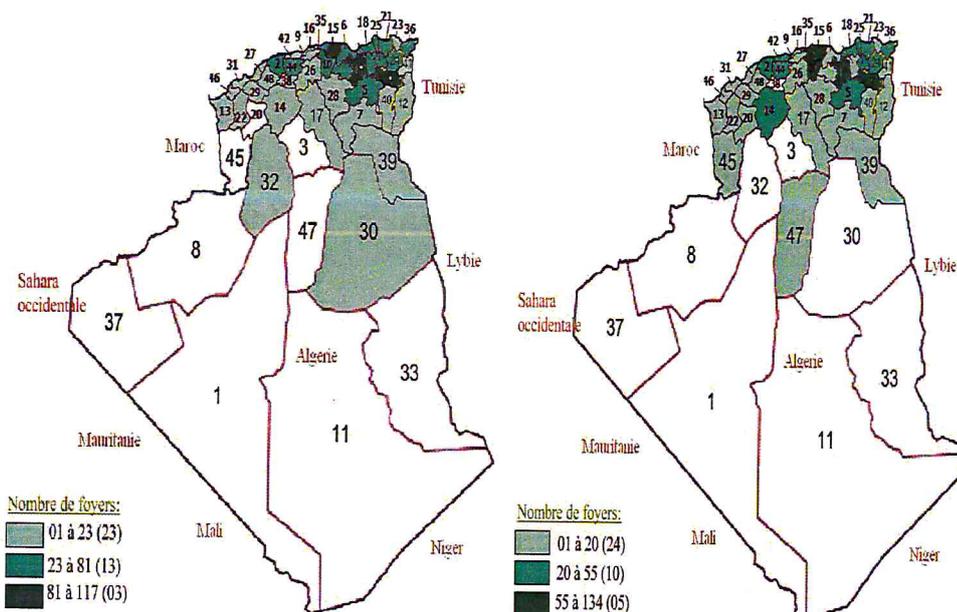


Figure 2 : Répartition des foyers de rage animale en Algérie en 2005/ 2006

#### I.4. Eléments de virologie concernant le virus de la rage

##### I.4.1. Classification

Le virus de la rage appartient à l'ordre des *Mononegavirales*, à la famille des *Rhabdoviridae* (du grec "Rhabdos" : baguette, faisant allusion à la forme en bâtonnet de ces virus) et au genre *Lyssavirus* (du grec "lyssa" : folie, rage, en raison des symptômes qu'entraîne cette maladie) (Chantal et Blancou, 1985). Tous les *Rhabdovirus* ont une apparence soit bacilliforme, soit en balle de fusil. La plupart des *Rhabdovirus* végétaux sont connus comme bacilliformes alors que la forme en balle de fusil domine parmi les *Rhabdovirus* animaux (Iwasaki, 1985).

Le virus rabique possède un génome à ARN négatif simple brin non segmenté. L'ensemble des virus possédant un tel génome forme l'ordre des *Mononegavirales*, comprenant 4 familles : *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bornaviridae* et *Rhabdoviridae*. Les *Rhabdoviridae* infectent de très nombreux hôtes, allant des insectes aux poissons et aux mammifères. Cette famille est divisée en 4 genres principaux : *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus* et *Novirhabdovirus* (Rupprecht *et al.*, 2002).

On dénombre actuellement 15 espèces de *Lyssavirus* classifiées ou en cours de classification (Tableau 1). La principale pourvoyeuse de la rage humaine est de loin l'espèce RABV également responsable de la rage canine (Haut Conseil de la santé publique, 2013).

Tableau 1: Classification des *Lyssavirus* (WHO, 2013)

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

\*En cours de classification

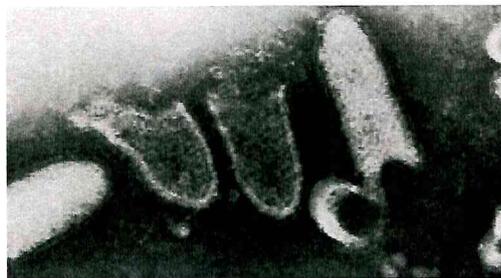
#### I.4.2. Structure du virus rabique

- **Morphologie du virion**

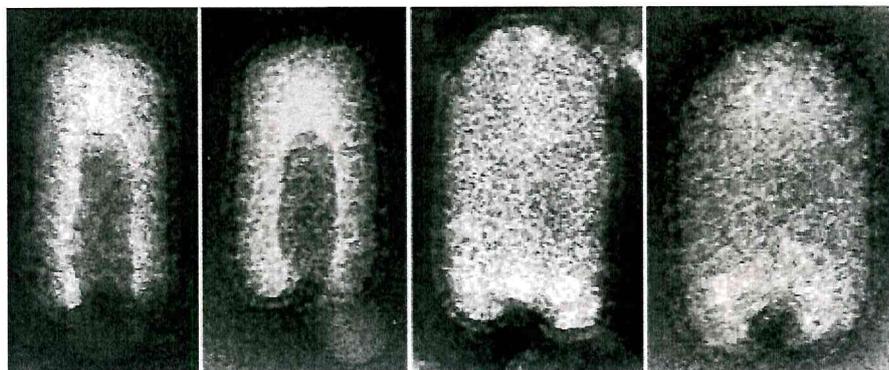
Les premières visualisations du virus rabique, en microscopie électronique, ont eu lieu dans les années 1950, lors de l'examen des corps de Negri observés dans le cerveau d'animaux infectés.

La technique de microscopie électronique à section fine, en 1962, a permis à Roots et Matsumoto de rapporter la première observation du virus dans la corne d'Ammon d'un cerveau de souris. Un an plus tard, l'adaptation du virus à des cultures cellulaires variées a augmenté son taux de multiplication, permettant sa purification et menant à la première description de ses aspects morphologiques. Depuis, d'autres études ont permis de définir précisément la morphologie du virus (Tordo et Poch, 1988).

Le virus rabique présente une forme générale allongée, cylindro-conique, rappelant celle d'un obus avec une extrémité conique et une autre plane (Figure 1 et 2). Le diamètre de la particule virale est relativement constant et mesure 75 nm. La longueur est quant à elle plus variable, allant de 100 à 300 nm selon la souche du virus et l'état défectif ou non des particules. La morphologie des particules virales a surtout été décrite d'après les images de préparation en coloration négative, de virions produits en culture cellulaire (Iwasaki, 1985).



**Figure 3 :** Virion rabique par microscopie électronique (Thoulouze et Lafon, 2000)



**Figure 4 :** Morphologie en "balle de fusil" du virus rabique en coloration négative (Vernon).

- **Structure du virion**

La coloration négative révèle l'agencement de la particule et permet de distinguer :

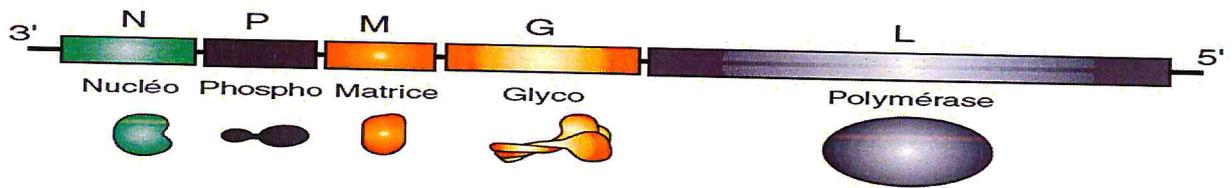
- Une nucléocapside centrale, formée d'un filament enroulé en spirale de révolution droite (74Å de périodicité, 150Å et 100Å de diamètre externe et interne), d'une longueur

pouvant atteindre 4 nm après déroulement. Il est constitué d'un axe nucléaire protégé par des sous-unités protéiques de 25 à 40 Å, en disposition périphérique hélicoïdale.

- Une enveloppe à double paroi, s'invaginant par l'extrémité plate dans l'axe de la particule, sur la moitié ou les trois-quarts de la longueur. Sa face externe présente une structure en nid d'abeilles correspondant à une disposition symétrique de couches sous-jacentes. Elle est aussi le lieu d'émergence de protubérances boutonnées ou spicules (6 à 8 nm) donnant à la surface de la particule un aspect régulièrement strié. Ces striations apparaissant espacées de 4,5 à 5 nm (Chantal et Blancou, 1985 ; Iwasaki, 1985).

Le fractionnement et l'analyse par électrophorèse des protéines permettent de distinguer les 5 constituants essentiels du virion (Figure 5) :

- ✚ La **glycoprotéine G** (PM=80 kDa) (505 aa), protéine transmembranaire qui constitue les spicules hérissant l'enveloppe virale. Elle intervient dans l'entrée du virus dans sa cellule hôte et dans le bourgeonnement des nouveaux virions. Elle est responsable de l'induction et de la liaison aux anticorps neutralisants ainsi que de la stimulation des cellules T, deux propriétés menant à l'établissement de la réponse immune humorale et cellulaire contre l'infection virale *in vivo*
- ✚ La **nucléoprotéine N** (PM=62 kDa) (450 aa), constituant structural majeur, est associée à la nucléocapside. Elle est fortement liée à l'ARN viral. Chaque protomère de N se lie à 9 nucléotides, formant une nucléocapside hélicoïdale (Albertini *et al.*, 2011).
- ✚ La **phosphoprotéine P** (297 aa) est liée à la nucléocapside. Son implication dans la multiplication virale a été démontrée par blocage par des anticorps monoclonaux (Albertini *et al.*, 2011).
- ✚ La **longue protéine L** (PM=160 kDa) (2130 aa), liée à la nucléocapside, est le composant enzymatique du complexe L-P polymérase. Cette protéine géante possède la majorité des activités enzymatiques nécessaires à la transcription et à la réplication du génome (Albertini *et al.*, 2011).
- ✚ La **protéine de la matrice M** (20-25 kDa) (202 aa), localisée en dessous de la membrane virale et qui relie la nucléocapside et la double couche lipidique. Composant structural important du virion, elle joue un rôle dans la condensation de la ribonucléoprotéine (Albertini *et al.*, 2011).

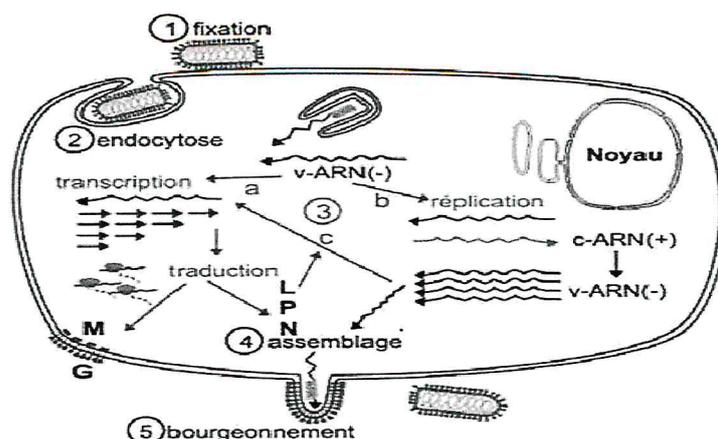


**Figure 5 :** Organisation du génome des *Lyssavirus* (Rotivel et Goudal, 2007)

### I.4.3. Cycle viral

Le cycle du virus rabique est intra-cytoplasmique. Les *Lyssavirus* peuvent utiliser différents composants de la surface des cellules pour pénétrer dans la cellule hôte, incluant les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine, les récepteurs au facteur de croissance des nerfs à faible affinité et des gangliosides (Rupprecht *et al.*, 2002).

Après liaison avec le récepteur de la cellule cible, le virus entre dans la cellule par endocytose. L'environnement acide de l'endosome provoque une modification de la conformation de la protéine G du virus, permettant ainsi la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire. La ribonucléo-protéine (composant actif de la transcription et de la réplication) est alors libérée dans le cytoplasme et constitue le brin matrice pour l'expression des gènes viraux et la réplication virale par l'ARN polymérase (complexe polymérase L-P). La transcription et la réplication virales ont lieu dans les corps de Negri qui sont des corps d'inclusion formés durant l'infection virale. Lors de la transcription, un ARN positif et 5 ARN messagers coiffés et polyadénylés sont synthétisés. La réplication produit des nucléocapsides contenant un ARN complet négatif qui servira à produire un ARN positif. Lors de la synthèse, le génome et l'anti-génome créés sont encapsidés par la protéine N. La ribonucléoprotéine néo-synthétisée sert de matrice pour une transcription secondaire ou est transportée vers la membrane cellulaire pour un assemblage avec les protéines M et G afin de produire de nouveaux virions. Ce cycle de réplication virale se fait en 18 heures pour le virus de la rage, RABV (Albertini *et al.*, 2011 ; Tordo et Poch, 1988).



**Figure 6:** Représentation schématique du cycle viral du virus rabique (Decoster et al.

[<http://www.microbes-edu.org/>])

#### I.4.4. Propriétés physico-chimiques du virus rabique

Le virus rabique est très fragile. S'il n'est pas protégé par un milieu riche en protéines, il perd tout pouvoir infectieux sous l'action de la chaleur, il est inactivé par les pH inférieurs à 4 et supérieurs à 10, il est détruit par les ammonium quaternaires, les détergents ioniques et non ioniques, les solvants organiques (éther, chloroforme, éthanol 45%) et le  $\beta$ -propiolactone ( $\beta$ PL), il est également sensible au rayonnement ultraviolets, il reste infectieux plusieurs jours entre 0 et 4°C (Lepine et Gamet, 1969). La putréfaction n'agit que très lentement. Galtier a observé que le bulbe d'un chien rabique, enterré depuis 144 jours, était encore parfaitement virulent (Abdi et Arifi, 2006). Il est conservé à -70°C ou lyophilisé à +4°C, conservé par la glycérine à 50% (Dahmani et Hami, 1996).

#### I.5. Pathogénie de la rage

##### I.5.1. Sources et mode de transmission

Le virus rabique doit nécessairement entrer par effraction dans l'organisme pour le contaminer, la transmission naturelle de la rage se faisant essentiellement par morsure, ou à travers des lésions de la peau, et exceptionnellement par la voie aérienne. Des cas de contamination par greffe d'organes et de cornée provenant de personnes n'ayant pas présenté de signes cliniques de rage ont été également rapportés dans différents pays (Tsiang, 1985).

En 2004 au Texas, quatre receveurs d'organes (deux reins, un foie et un segment d'artère iliaque) provenant d'un donneur commun sont morts d'encéphalite moins de 30 jours après leur transplantation respective. L'investigation a permis de diagnostiquer la présence du virus rabique

chez les 4 receveurs. L'entourage du donneur a rapporté que celui-ci s'était fait mordre par une chauve-souris quelque temps avant son décès par hémorragie sub-arachnoïde (Srinivasan *et al.*, 2005).

De même, toujours aux Etats-Unis, en février 2013 ; un patient ayant reçu une greffe d'un rein est décédé de rage, 18 mois après sa transplantation alors qu'il n'avait jamais été exposé à des animaux suspects de rage. Le virus rabique a par la suite été mis en évidence dans d'autres organes du donneur et notamment dans son système nerveux central. Le séquençage de l'ARN du virus extrait des tissus du donneur a permis une comparaison phylogénétique du virus : le gène codant pour la protéine N du virus du donneur était à 99,9% identique à celui du virus de raton-laveur. Les symptômes présentés par le donneur peu de temps avant sa mort cérébrale sont apparus comme concordant avec une encéphalite causée par le virus rabique.

La morsure est donc le mode de transmission principal du virus ; il faut également prendre en compte le léchage ainsi que le simple contact avec une peau ou une muqueuse présentant des érosions ou excoriations même mineures (Ruppercht *et al.*, 2002).

### **I.5.2. Etapes de l'infection et excrétion du virus**

#### **➤ Multiplication locale du virus**

Le virus rabique peut se multiplier localement dans les cellules musculaires au point d'inoculation, avant de migrer vers le système nerveux central (SNC) qui est son site privilégié de multiplication. La présence du virus peut être détectée pendant 2 à 3 jours au point d'inoculation périphérique. Par la suite, la présence de particules virales infectieuses n'est plus mise en évidence localement.

#### **➤ Pénétration dans le système nerveux périphérique**

La phase neurotrope de l'infection rabique commence quand les particules virales sont internalisées, vraisemblablement au niveau des terminaisons nerveuses du système nerveux périphérique. L'implication des terminaisons sensorielles ou motrices dans la dissémination complète du virus n'est pas bien déterminée. Ainsi que cela a été indiqué plus haut (cycle viral p.), le récepteur nicotinique de l'acétylcholine joue le rôle de corécepteur pour le virus rabique.

#### **➤ Migration centripète du virus rabique**

Contrairement à la plupart des infections virales, la dissémination du virus vers le SNC se fait sans intervention d'une phase virémique infectante. De nombreuses expériences ont permis de

montrer que le virus migre du point d'inoculation périphérique vers le SNC à travers le flux axoplasmique rétrograde passif. Cependant, on ne sait pas sous quelle forme moléculaire le virus est transporté dans le système nerveux périphérique. Au cours de la dissémination du virus vers le SNC, certains ganglions nerveux dans le fonctionnement général du SNC. De telles altérations ont effectivement pu être mises en évidence au niveau des récepteurs de certains neurotransmetteurs (Tsiang, 1985). Un certain nombre d'aspects physiopathologiques et cliniques doivent être considérés comme communs à l'Homme et à tous les animaux, qu'ils soient domestiques ou sauvages, car ils varient plus entre individus d'une même espèce qu'ils ne varient entre ces espèces. Il s'agit de la durée d'incubation, de la durée de la maladie, de l'excrétion salivaire du virus et de certains symptômes généraux.

La durée d'incubation est en général fonction directe de la quantité de virus inoculé et du site de morsure. Cette dernière est d'autant plus grave qu'elle affecte des zones richement innervées ou proches du cerveau. Les morsures à la tête, au cou ou aux membres antérieurs sont donc souvent suivies de périodes d'incubation plus courtes que lorsque la morsure se situe plus bas sur le tronc ou sur les membres postérieurs. La période d'incubation varie également beaucoup en fonction de l'espèce atteinte. Elle dure en moyenne de 15 à 60 jours chez le chien alors que chez les ruminants elle varie entre 30 et 90 jours. Chez l'Homme, l'incubation est comprise entre 35 et 90 jours dans 85% des cas (Toma *et al.*, 2012). L'incubation est donc très variable, en moyenne de 2 à 3 mois, mais pouvant aller de 10 jours à plusieurs mois voire plusieurs années (WHO, 2005).

#### ➤ **Excrétion du virus**

Quant à l'excrétion salivaire, elle semble plus varier selon la co-adaptation entre souche virale et espèce hôte que de façon intrinsèque à la souche ou à l'espèce contaminée. Ainsi, elle est de 85 à 100% chez le renard contaminé par une souche vulpine et le chien contaminé par une souche canine, mais beaucoup plus faible si l'on intervertit les souches ou si l'on s'adresse à d'autres espèces (Barrat et Rollin, 1985). En effet, dans l'étude de Wandeler *et al.* (1974), 93% des renards enrégés présentaient des cultures cellulaires positives des glandes salivaires alors que ce pourcentage diminuait à 83% pour les blaireaux enrégés et seulement 50% pour les fouines enrégées (Wandeler *et al.*, 1974). Le virus peut être présent dans la salive des animaux avant et après le développement des signes cliniques et la durée de cette excrétion salivaire est propre à chaque espèce (Rupprecht *et al.*, 2002).

Cette excrétion salivaire pré-symptomatique du virus constitue un réel risque de transmission pour l'homme qui ne se doute pas que l'animal mordeur est contagieux puisqu'il ne présente pas encore de signe clinique (Barrat et Rollin, 1985).

Le virus peut également être retrouvé dans d'autres organes que les glandes salivaires et le système nerveux. En effet, des inoculations à des chiens ont permis de mettre en évidence le virus viable dans la cornée, le cœur, la langue et le pancréas de certains animaux. Des antigènes viraux ont également été mis en évidence dans la peau, les muscles, les ovaires, les testicules et les intestins de certains chiens inoculés et morts de rage. Néanmoins, la présence de virus dans ces organes ne joue pas un rôle aussi important dans l'épidémiologie de la rage que dans les glandes salivaires, car ces organes ne permettent pas une excrétion et une transmission du virus. De plus, il faudrait être certain que les virions isolés n'étaient pas dans des fibres nerveuses présentes dans ces organes, mais bien dans le tissu même de l'organe (Fekadu et Shaddock, 1984).

### **I.5.3. Signes cliniques**

Les signes cliniques de la rage sont rarement définitifs. Les animaux enrégés montrent habituellement des signes typiques d'atteinte du SNC, avec des variations mineurs entre les espèces (Cynthia *et al.*, 2008). Ainsi, que ce soit chez l'homme ou chez les animaux, on pourra noter comme symptômes généraux :

- 🚩 des **troubles psychiques**, se traduisant par un changement de comportement ou de caractère: tendance inhabituelle soit à des manifestations d'affection exagérée ou inversement de fuite de tout contact humain, soit à l'agressivité. Cette dernière se déclenche surtout lorsque l'on dérange le malade ;
- 🚩 des **troubles de l'appétit**, perversion du goût, voire refus total de s'alimenter ou de boire. Attention, l'hydrophobie caractéristique chez l'Homme n'existe pas chez l'animal qui essaie encore de boire ou de manger mais ne parvient pas à déglutir à cause d'une paralysie du carrefour pharyngé ;
- 🚩 des **troubles neuromusculaires** qui se traduisent soit par des difficultés de motricité générale allant jusqu'à une paralysie totale (qui peut s'installer d'emblée), soit par des difficultés de déglutition entraînant une salivation permanente et exagérée soit par des difficultés vocales: voix ou cris de tonalité anormale émis avec une fréquence inhabituelle, ou inexistant (rage muette).

Mais il faut bien savoir que tous ces signes généraux peuvent ne pas coexister, voire ne pas exister du tout, dans certains cas d'évolution foudroyante par exemple. Ils peuvent également ne pas être remarqués si l'on n'observe pas régulièrement l'animal atteint (Barrat et Rollin, 1985).

Le terme rage furieuse se réfère aux animaux dont l'agressivité est prononcée. La rage paralytique ou rage muette se réfère aux animaux dont les modifications du comportement sont minimales. Et pour lesquels la maladie se manifeste principalement par une paralysie.

#### ❖ **Forme furieuse**

C'est le syndrome classique du chien fou, bien que cela puisse être observé chez toutes les espèces. Il y a rarement des signes de paralysie à ce stade. L'animal devient irritable et, dès la moindre provocation, peut utiliser de manière agressive ses dents, ses griffes, ses cornes ou ses sabots. La posture et l'expression sont celles d'un animal hyper vigilant et anxieux, avec des pupilles dilatées. Le bruit incite l'animal à attaquer. De tels animaux perdent toute prudence ou crainte face aux autres animaux. Les carnivores présentant cette forme de rage errent souvent sur de vastes étendues en attaquant les autres animaux, les personnes et tout objet en mouvement. Ils avalent fréquemment des corps étrangers comme des fèces, la paille, des bâtons ou des pierres. Les chiens enragés peuvent mordre les câbles et les barres de leurs cages, se cassant les dents. Ils vont suivre la main que l'on bouge devant la cage, en essayant de la mordre. Les chiots peuvent chercher la compagnie humaine et sont excessivement joueurs, mais mordent même lorsqu'ils sont caressés. Devenant habituellement violents en quelques heures.

Lorsque la maladie évolue, une incoordination musculaire et des crises convulsives sont fréquemment observées. La mort résulte d'une paralysie progressive.

#### ❖ **Forme paralytique**

Elle se manifeste d'abord par une paralysie de la gorge et des muscles masséters, souvent avec une salivation abondante et une incapacité à avaler. La mâchoire inférieure est fréquemment pendante chez le chien. Les propriétaires examinent souvent la bouche des chiens et du bétail à la recherche d'un corps étranger ou administrent des médicaments à mains nues, s'exposant ainsi au virus de la rage. Ces animaux peuvent ne pas être agressifs et tentent rarement de mordre. La paralysie évolue rapidement vers toutes les parties du corps, et le coma et la mort s'ensuivent en quelques heures (Cynthia *et al.*, 2008).

## I.6. Diagnostic

Le diagnostic clinique est difficile, en particulier dans les régions où la rage est rare, et on ne doit pas s'y fier lorsque l'on est amené à prendre des décisions en matière de santé publique (Cynthia *et al.*, 2008).

Le diagnostic de la rage a été l'objet de nombreuses améliorations au cours des dernières années, tant dans sa technique générale que dans sa précision.

Mises à part quelques techniques *ante-mortem* encore infidèles (ex. : recherche de l'antigène viral dans le calque de la cornée), le diagnostic de la rage n'est réellement fiable que *post-mortem*. Il repose sur la mise en évidence des «cicatrices» histologiques ou cytologiques de l'infection, sur celle de l'antigène viral, ou sur celle du pouvoir pathogène du virus.

Dans le premier groupe on classe les *techniques histologiques* : coloration des tissus nerveux par la technique de Sellers (sur frottis), de Mann (sur coupes histologiques).

Relativement peu sensibles, ces techniques permettent de détecter 60 à 95 % des cas positifs en quelques minutes (Sellers) ou 4 jours (Mann).

Dans le second groupe se classent les *techniques immuno-chimiques* :

- ✚ l'immunofluorescence directe : les anticorps dirigés contre la nucléocapside virale sont couplés à la fluorescéine. Ils permettent de repérer le virus dans les cellules infectées (frottis de tissu suspect ou culture cellulaire) dans 97 à 99 % des cas, et en quelques heures ;
- ✚ l'immuno-enzymologie : les anticorps sont alors couplés à la Peroxydase, dont la présence est révélée par une réaction colorée pouvant être visible à l'œil nu, avec une sensibilité de 56 à 99 % selon les laboratoires. Ce nécessaire (trousse "RREID" = Rapid Rabies Enzyme Immunodiagnosis) est commercialisé en France.

Dans le dernier groupe se classent les *techniques de détection du pouvoir pathogène* du virus *in vivo* ou *in vitro* : l'inoculation intracérébrale à la souris a une sensibilité équivalente à la réaction d'immunofluorescence, mais requiert 6 à 28 jours d'observation. L'inoculation à la cellule (neuroblastome) ne requiert que 2 à 5 jours, avec une sensibilité équivalente (Barrat *et al.*, 1989).

## **I.7. Traitement**

Il n'existe pas de traitement efficace après l'apparition des premiers symptômes et finalement depuis la vaccination de Joseph Meister en 1885 par Louis Pasteur, aucun progrès majeur n'a été fait en matière de thérapeutique post infection par le virus de la rage.

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

## **I.8. Prophylaxie**

### **I.8.1. Prophylaxie sanitaire**

#### **❖ Pays indemnes**

**Rage canine :** le principe est d'empêcher l'importation d'un animal en incubation de rage. Les mesures défensives peuvent consister, selon le niveau de protection désiré :

- En une **interdiction** pure et simple d'importation (ex. : Australie, Nouvelle-Zélande...),
- En une **mise en quarantaine** prolongée (ex. : Grande-Bretagne : 6 mois pour les carnivores domestiques provenant de pays d'enzootie rabique),
- En un **certificat sanitaire** attestant que l'animal est en bonne santé et qu'il provient d'un pays indemne de rage.

Ces mesures peuvent être efficaces mais certaines connaissent des défaillances (ainsi, quelques cas de rage ont été observés en Grande-Bretagne au cours des dernières décennies sur des animaux importés et soumis à 6 mois de quarantaine) et par ailleurs, sont d'application difficile. C'est pourquoi certains pays ont recours à la prophylaxie médicale, associée ou non aux mesures évoquées ci-dessus (ex. : Grande-Bretagne pour les carnivores domestiques provenant de pays d'enzootie rabique : quarantaine de 6 mois, avec vaccination obligatoire au début de la quarantaine ; actuellement, vaccination avec contrôle sérologique).

**Rage des animaux sauvages :** le principe consiste à diminuer fortement la densité de population de l'espèce animale vectrice potentielle dans une bande de terrain assez large le long de la frontière avec le pays où la maladie sévit.

En fait, l'expérience prouve (progression de la rage vulpine en Europe par exemple) que, sauf cas particuliers de disposition géographique favorable (ex. : le Danemark), les mesures mises en œuvre sont d'une efficacité insuffisante et que l'on ne peut pas protéger un pays indemne contre l'extension d'une rage véhiculée par des animaux sauvages sauf s'il s'agit d'une île ou d'une presqu'île.

❖ **Pays infectés**

○ **Rage canine**

**Plan général :** pour empêcher la transmission du virus rabique par le chien, il importe de limiter les possibilités de rencontre entre animaux de cette espèce, ainsi qu'avec le chat ; par conséquent:

- Capture et destruction des chiens et chats errants
- Contrôle strict de la circulation des chiens et chats ; en particulier, circulation des chiens tenus en laisse, éventuellement avec muselière,
- Par ailleurs, mêmes mesures qu'en pays sain vis-à-vis des animaux importés.

**Plan individuel :** Mesures vis-à-vis des différentes catégories d'animaux :

- **Animal sûrement enragé** (l'attention est attirée sur la difficulté d'être sûr qu'un animal est enragé) : Sacrifice immédiat.
- **Animal suspect de rage : Mise en observation** pour suivre l'évolution clinique ; si celle-ci risquait d'être la cause de contaminations humaines (animal très dangereux, échappé...): sacrifice.
- **Animal contaminé** (c'est-à-dire ayant été mordu par, ou ayant eu un contact étroit avec un animal enragé) : **Sacrifice** ; si l'animal contaminé était en état d'immunité antirabique au moment de la morsure et si l'on peut contrôler correctement ses mouvements au cours des mois suivants, on peut envisager un rappel de vaccination et une conservation de l'animal.

**Animal mordeur :** Tout animal mordeur doit être **mis en observation** afin de vérifier l'évolution de son état de santé (possibilité ou non d'excrétion virulente salivaire au moment de la morsure) ; l'O.M.S. prévoit une surveillance pendant 10 jours (**Toma, 2006**).

En Algérie, tout animal mordeur doit être mis sous surveillance pendant 15 jours, et au cours de cette surveillance son état de santé doit être contrôlé 3 fois :

- ✓ Le plus tôt possible après la morsure

- ✓ Le 7<sup>ème</sup> jour après la morsure (à ce moment s'il est resté sain on peut affirmer qu'il y a 95 à 100% de chance pour que l'animal n'ait pas été excréteur de virus rabique, le jour de la morsure)
- ✓ 15<sup>ème</sup> jour après la morsure

La mise en œuvre de l'ensemble de ces mesures fournit d'excellents résultats dans tous les pays possédant un système sanitaire bien structuré. Elles ont permis de faire disparaître la rage canine de la quasi totalité des pays d'Europe, des Etats-Unis, du Canada... En revanche, leur application se heurte à de très grandes difficultés techniques et financières dans différents pays d'Afrique et d'Asie et au nombre très élevé de chiens errants.

○ **Rage des animaux sauvages terrestres**

Le principe fondamental est de **limiter la densité de population de l'espèce sauvage** responsable de la transmission du virus et, si possible, de la faire descendre au-dessous du seuil de densité permettant la transmission du virus. Nous prendrons comme exemple la rage vulpine.

Pour la rage vulpine, le seuil de densité n'est pas connu exactement ; il a été estimé par certains aux environs de 0,2 renard par km<sup>2</sup>, soit un renard pour 500 hectares (Toma, 2006).

**I.8.2. Prophylaxie médicale**

Elle consiste en la vaccination des populations animales. Depuis quelques années, les animaux domestiques sont pris en charge par la vaccination préventive au vue des pertes causées par la rage.

Chez l'homme, la vaccination peut être préventive chez les personnes ayant un risque élevé d'exposition à la rage, ou curative en association avec l'administration d'immunoglobulines antirabiques humaines ou équine en cas d'exposition à un risque rabique (Toma, 2008).

## **Chapitre 2 :**

# **Les vaccins antirabiques**

## II. Les vaccins antirabiques

### II.1. Définition de la vaccination

La vaccination consiste à immuniser une personne contre une maladie infectieuse, généralement en lui administrant un vaccin. Les vaccins, qui stimulent le système immunitaire, prémunissent la personne d'une infection ou d'une maladie (OMS, 2015). La vaccination contre la rage consiste en l'administration à l'organisme, d'un antigène rabique capable de lui conférer une résistance ultérieure en vers cette maladie (Andral et Blancou, 1982).

### II.2. Définition d'un vaccin

Un vaccin est une préparation antigénique qui a pour but d'induire chez la personne ou l'animal qu'on vaccine, une réponse immunitaire spécifique d'un agent pathogène capable de le protéger contre l'infection naturelle ou d'en atténuer les conséquences (Launay, 2007).

### II.3. Les différents types de vaccins

#### II.3.1. Les vaccins à virus modifié, non inactivés

Deux souches de virus modifiés ou leurs dérivées, sont principalement utilisées dans le monde: Flury et S.A.D. (les souches Kissling et Kelev étant peu répandues hors de leur pays d'origine).

##### II.3.1.1. Les vaccins réalisés à partir de la souche Flury

Cette souche isolée en 1939 de la jeune Miss Flury, contaminée par un chien, fut adaptée à l'œuf embryonné et proposée comme virus-vaccin après 50 passages (Koprowski *et al*, 1948) sous le nom de *Flury Low Egg Passage* (L.E.P.) puis, après 130 passages supplémentaires, Koprowski *et al* (1954) sous le nom de *Flury High Egg Passage* (H.E.P.). Cette souche est actuellement utilisée comme vaccin à virus modifié dans de nombreux pays après répllication soit *in ovo*, soit sur culture cellulaire. Bien que des accidents anciens ou récents (WHO, 1980) en aient restreint, ou même interdit l'usage dans certaines conditions, elle peut rendre encore de grands services lorsqu'elle est correctement produite, conservée et utilisée, du fait de son faible coût de production et de la bonne immunité qu'elle confère.

### II.3.1.2. Les vaccins réalisés à partir de la souche S.A.D.

Cette souche a été isolée en 1935 d'un chien mort de 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.

Elle est actuellement utilisée dans de très nombreux pays comme vaccin après culture sur cellules de reins de hamster, chien, bovin ou porc. Lors de son adaptation à ce dernier système par les laboratoires canadiens Connaught (Abelseth, 1969).

### II.3.1.3. Les caractéristiques générales des vaccins à virus modifié, non inactivés

Les deux caractéristiques majeures d'un vaccin peuvent être ainsi définies dans le cas des vaccins antirabiques non inactivés :

- ✦ leur **innocuité** dépend de la stabilité génétique de la souche, mais aussi de ses conditions d'emploi ;
- ✦ leur **efficacité** (valeur antigénique et durée de l'immunité conférée) peut varier selon la nature, l'intégrité antigénique et le niveau de réplication de la souche *in vivo*. L'immunité conférée peut atteindre 2 à 3 ans dans de bonnes conditions. Ce type de vaccin est lyophilisé et, généralement, non associé à d'autres antigènes, ni additionné d'adjuvant. Il est injecté à la même dose quelle que soit l'espèce animale

### II.3.2. Les vaccins à virus inactivé

Ce type de vaccin a donné lieu à une production beaucoup plus diversifiée que celle des virus vaccins non inactivés. Elle fait appel à un nombre beaucoup plus important de souches vaccinales, de même qu'à des supports différents, *in vivo* ou *in vitro*, de la réplication virale.

En effet l'atténuation du pouvoir pathogène de la souche pour l'espèce cible n'étant plus imposée, souches et substrats peuvent varier d'un laboratoire à l'autre. Il est resté cependant possible de distinguer deux grands groupes parmi ces vaccins

#### II.3.2.1. 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 : moutons, chèvres, lapins, rats, souris sont les plus couramment utilisés permettant d'obtenir une récolte d'encéphales importante, mais de titre viral faible ;
- animaux jeunes, ou nouveau-nés : chevreaux, cabris, lapereaux, ratons, 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.3.2.2. 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 de 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 re-dénommée «*Challenge Virus Standard* » (C.V.S.) ; Pitman-Moore (P.M.) ; Pasteur virus 11e passage (P.V. 11); Kissling, etc. Bien que l'O.M.S. recommande de n'utiliser qu'une seule souche de virus rabique fixe pour la fabrication des vaccins (WHO, 1980).

### II.3.2.3. Les caractéristiques générales des vaccins à virus inactivé

Comme précédemment, deux caractéristiques majeures sont à envisager :

- **L'innocuité** du vaccin est pratiquement totale si le vaccin est correctement fabriqué, c'est-à-dire qu'il ne peut exister, avec ce type de produit, de rage vaccinale. Toutefois, la réalité de l'inactivation doit être vérifiée par des tests fiables et sensibles. Cette sensibilité peut être accrue par concentration du virus ou l'emploi de système très sensible (cellules +DEAE par exemple). Les accidents de sensibilisation (hypersensibilité de type retardé ou anaphylaxie) sont également pratiquement inexistantes puisque les injections vaccinales sont très espacées.
- **L'efficacité**, c'est-à-dire niveau et 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 inférieure à 0,3 U.I. par dose (WHO, 1980) mais pas nécessairement trop élevée (Blancou et al, 1980).

La durée de l'immunité conférée peut, comme pour les vaccins non inactivés, atteindre deux à trois ans dans de bonnes conditions (Soulebot, 1980). Le vaccin peut être présenté sous forme lyophilisée (stable au moins 18 mois) ou liquide (stable au moins 12 mois). L'addition d'adjuvants de l'immunité est souvent pratique pour ce type de vaccins, surtout ceux obtenus sur culture cellulaire, utilisant principalement l'hydroxyde d'alumine (chiens, équins) ou la saponine (bovins) ; cette addition accroît le niveau et la durée de la réponse humorale pour l'espèce cible.

#### **II.4. Le contrôle des vaccins**

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

##### **II.4.1. Vaccin à virus inactivé**

- **Innocuité** : vérifiée par injection intracérébrale à la souris et intramusculaire à 2 animaux au moins de l'espèce à laquelle est destiné le vaccin.
- **Efficacité**

*Le test de Habel* : très longtemps utilisé, est de plus en plus abandonné du fait de son imprécision pour les vaccins de valeur moyenne, et des difficultés de standardisation au niveau européen (Bussereau et Blancou, Aubert, 1981). Il consistait à éprouver des souris, vaccinées ou non, avec des doses croissantes de virus et à quantifier l'écart de la dose létale 50 % existant entre l'un et l'autre groupe : cet écart devrait être au minimum de 1 à 1 000.

*Le test des National Institutes of Health (N.I.H.)* est actuellement le plus utilisé. Il consiste à éprouver, avec une même dose de virus, des souris ayant reçu 2 injections intra-péritonéales des diverses dilutions du vaccin à tester. L'efficacité du vaccin est quantifiée par sa dilution finale encore protectrice, à 50 % qui a l'avantage de pouvoir être exprimée en unités internationales grâce à l'emploi simultané d'une préparation de référence internationale ou de son sous étalon (Kaplan et Koprowski, 1974). Un seuil limite de 0,3 à 1 unité internationale par dose est actuellement requis par les réglementations nationales ou internationales. Ce test, bien que s'éloignant beaucoup des conditions naturelles d'immunisation et d'épreuve, semble bien refléter la valeur réelle des vaccins antirabiques (Aubert *et al.*, 1981). C'est, actuellement, le moins

mauvais des tests existants, mais plusieurs autres techniques ont été récemment proposées qui pourraient le compléter, voire le remplacer.

#### **II.4.2. Vaccin à virus modifié non inactivé**

- **Innocuité** : elle peut être vérifiée par inoculation musculaire à au moins 20 cobayes et 2 animaux de l'espèce la plus réceptive à laquelle est destiné le vaccin.
- **Efficacité** : elle est vérifiée par la détermination du titre du virus-vaccin, et par l'inoculation musculaire à au moins 10 cobayes dont 70 % doivent résister à l'épreuve virulente alors que 80 % des témoins meurent (British Pharmacopoeia, 1977).

#### **II.5. Notion d'adjuvants**

L'adjuvant désigne toute substance capable d'augmenter l'intensité de la réponse immunitaire dirigée contre un antigène administré simultanément. Il existe une multitude d'adjuvants, de nature et d'origine extrêmement diverses. On distingue parmi les adjuvants les agents immunostimulants et les véhicules. Les premiers activent directement les cellules de l'immunité en se liant à différents récepteurs. Les seconds contiennent l'antigène et déterminent la façon dont il sera présenté au système immunitaire. Cependant, les véhicules ont souvent eux-mêmes des propriétés immuno-stimulantes, simplement parce qu'ils constituent des corps étrangers.

Bien qu'ils soient également testés dans le cadre de certaines immunothérapies, les adjuvants sont surtout utilisés en tant que constituants de vaccins. La plupart du temps, ils sont indispensables à l'installation d'une réponse immunitaire protectrice. En effet, le pouvoir immunogène d'un vaccin non adjuvé, surtout s'il est inactivé, est souvent trop faible car la vaccination ne peut imiter parfaitement une infection naturelle. Les vaccins sous-unitaires en cours de développement, qui se réduisent parfois à de simples peptides, sont particulièrement concernés par ce problème. Même s'ils contiennent les épitopes protecteurs adéquats, ils manquent d'un agent capable d'amplifier et d'orienter la réponse immunitaire spécifique sans en être la cible; c'est à ce titre qu'interviennent les adjuvants.

Les adjuvants se retrouvent tant dans les vaccins humains que vétérinaires. L'alum par exemple, seul adjuvant actuellement enregistré pour la médecine humaine, est utilisé dans de nombreux vaccins vétérinaires. Au niveau expérimental, les deux types de vaccins bénéficient du développement de nouveaux adjuvants tels que les saponines ou les oligonucléotides CpG.

Toutefois, même si les exigences en matière d'innocuité et d'efficacité sont semblables dans les deux cas, la mise au point de vaccins vétérinaires doit absolument tenir compte de contraintes telles que les coûts de production et les limites de résidus (Vermout, 2003).

### **II.6. Mode d'action, efficacité et toxicité des principaux adjuvants**

Cette section décrit les mécanismes biologiques qui président à l'action des adjuvants, ainsi que les effets de chaque adjuvant sur la réponse immune. Les effets toxiques de ces préparations et les modalités d'utilisation particulières y sont également présentés. Les connaissances concernant les effets des adjuvants sont cependant loin d'être complètes et certains aspects de leur activité peuvent ne pas avoir été étudiés.

Un adjuvant efficace ne doit pas seulement renforcer la réponse immune, mais aussi orienter cette réponse en fonction de la pathogenèse propre à chaque infection. Chaque adjuvant est d'abord caractérisé par sa capacité d'activer sélectivement les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) de type Th2 ou Th1, qui correspondent aux deux grandes voies que peut emprunter la réponse immune, à savoir humorale et cellulaire. Cette dichotomie a été mise à jour chez la souris en comparant les effets des sels d'aluminium et de l'ACF (l'adjuvant complet de Freund), les premiers induisant une réponse de type Th2 et les seconds une réponse de type Th1 (Grun et Maurer, 1989). Un adjuvant peut aussi favoriser des aspects plus particuliers de la réponse immune, comme par exemple la réponse d'hypersensibilité de type retardé (DTH, Delayed Type Hypersensitivity) ou la réponse à lymphocytes T cytotoxiques (CTL, Cytotoxic T Lymphocytes), qui correspondent à deux paramètres de l'immunité à médiation cellulaire (IMC), ou encore la production d'IgA sécrétoires dans un contexte Th2. Il peut aussi influencer l'isotype des immunoglobulines produites. La dichotomie Th1/Th2, qui repose sur les observations faites chez la souris, n'est pas toujours aussi nette chez les autres espèces. Néanmoins, étant donné que les nouveaux adjuvants sont d'abord testés chez la souris, cette distinction reste largement utilisée (Jensen et *al.*, 1998).

#### **Les polysaccharides**

Les dextrans, mannanes, glucanes ont été utilisés en tant qu'adjuvants. Par ailleurs, les chitosans, polymères obtenus par déacétylation de la chitine, semblent constituer des véhicules efficaces au niveau des muqueuses, en raison notamment de leur capacité de perméabiliser les muqueuses aux antigènes (Van der Lubben et *al.*, 2001)

Tableau 2 : Origine et propriétés des principaux adjuvants

Adjuvant	Origine ou composition chimique	Effets sur la réponse immunitaire
Alum	Minérale	Stimulation de la réponse en anticorps (Th2)
Adjuvant incomplet de Freund et adjuvants huileux	Emulsions eau dans huile (huiles minérales ou végétales + agents de surface)	Importante production d'anticorps; fortement inflammatoires
Adjuvant complet de Freund	Emulsion eau dans huile + mycobactéries entières inactivées	Réponse mixte humorale et cellulaire
Syntex Adjuvant Formulation et formulations apparentées	Emulsions huile dans eau à base de squalène et de copolymères synthétiques	Stimulation de la réponse en anticorps
Monophosphoryl lipide A	Composant bactérien dérivé du lipopolysaccharide	Stimulation préférentielle de la réponse de type Th1
Muramyl dipeptide et dérivés	Composants de paroi des mycobactéries	Stimulation préférentielle de la réponse en anticorps
Oligonucléotides CpG	Motifs moléculaires propres aux génomes procaryotes	Induction de réponses de type Th1
Cytokines	Protéines généralement utilisées sous forme recombinante	Action directe et spécifique, mais dépendant de la dose et de l'espèce cible
Saponines et immuno stimulating complexes	Agents amphiphatiques d'origine végétale, permettant la formation de structures vésiculaires	Production d'anticorps et stimulation des lymphocytes T cytotoxiques
Amines lipophiles	Agents de surface amphiphatique	Induction de réponses de type hypersensibilité retardée
Imidazo-quinolones	Composés synthétiques de faible masse moléculaire	Induction de réponses de type Th1 ; stimulation des lymphocytes T cytotoxiques
Toxines bactériennes	Sous formes entière, inactivée, sous-unitaire ou mutée	Favorisation des réponses de type Th2; production d'IgA sécrétoires
Polysaccharides	Diverses	Stimulation de l'immunité au niveau des muqueuses

# **Partie expérimentale**

# **Problématique et objectifs**

## **I. Problématique et objectif**

### **I.1. Problématique**

La rage est une maladie infectieuse, virulente, inoculable généralement par morsure (Lepine et Gamet, 1969). Elle est à l'origine de quelque 55 000 décès annuels dans le monde, le plus souvent suite à une infection transmise par des chiens contaminés. Cette situation a conduit, à la prise en charge par la vaccination préventive des animaux domestiques de compagnie et rente (surtout les bovins) en Algérie. Même avec cette prophylaxie médicale, les cas de rage ne cessent d'être déclarés en santé publique. Un ensemble de questions nous taraudent l'esprit concernant cette situation, allant du vaccin jusqu'à la vaccination. Un adjuvant efficace ne doit pas seulement renforcer la réponse immunitaire d'un vaccin, mais aussi orienter cette réponse en fonction de la pathogenèse propre à chaque infection. Notre travail est basé sur l'effet d'un adjuvant polysaccharidique sur la valeur antigénique d'un vaccin antirabique tissulaire.

### **I.2. Objectifs**

- Evaluer l'efficacité d'associer un adjuvant polysaccharidique au vaccin rabique ;
- Etudier la répétabilité et la reproductibilité des résultats,
- Calculer la dose effectrice 50 (DE<sub>50</sub>) des vaccins rabiques adjuvé et non adjuvé,
- Estimer la valeur antigénique des vaccins rabiques adjuvé et non adjuvé,
- Tirer des conclusions sur l'association d'un adjuvant polysaccharidique aux vaccins rabiques.

## **II. Matériels et Méthodes**

### **II.1. Matériels biologiques**

#### **❖ Le vaccin**

Il s'agit d'un vaccin à virus inactivés lyophilisés (souche LPS) produit sur cerveaux de souriceaux nouveau-nés, il est produit localement au niveau de l'institut Pasteur d'Algérie (IPA).

❖ **L'adjuvant**

L'adjuvant utilisé dans cette expérimentation est de nature polysaccharidique.

❖ **Les souris**

Les animaux retenus pour l'expérimentation sont des souris N'MRI albinos, à bonne croissance, âgées de 4 à 6 semaines pesant chacune (15g±16g), saines de sexe male et femelle, élevées à l'institut Pasteur d'Algérie au niveau de laboratoire des vaccins viraux humains.

• **Le Virus CVS**

La souche virale CVS (Virus Challenge Standard) est habituellement utilisée comme virus d'épreuve dans le test d'activité des vaccins antirabique, elle est entretenue au service des vaccins viraux humains depuis des années.

**II.2. Matériels non biologiques**

- Pot contenant des glaçons
- Tubes en verre
- Tube de canne
- Flacons d'eau bi-distillée
- Solution d'Enders
- Sérum de veau foetal (SVF)
- Seringue à usage unique (de 2.5mL pour l'inoculation des souris)
- Seringue à usage unique (de 1mL pour le challenge)
- Vortex
- Gants et lunettes de protection
- Grille pour contention des souris
- Micropipettes P1000, P200

## **II.3. Méthodes**

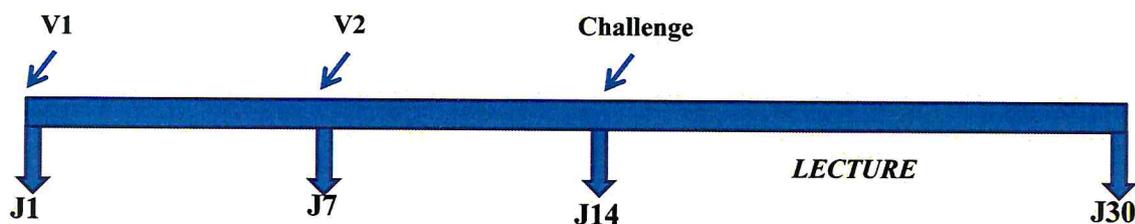
### **II.3.1. Conception de l'expérimentation**

Notre travail a été réalisé dans le service des vaccins viraux humains de l'Institut Pasteur annexe de Kouba, pendant la période qui s'étale du 1<sup>er</sup> décembre 2014 jusqu'au 1<sup>er</sup> février 2015.

Dans notre travail nous avons utilisé le test NIH qui consiste à immuniser des souris avec des concentrations variable de deux vaccins (adjuvé et non adjuvé), puis les soumettre à une épreuve virulente avec la souche virale d'épreuve (CVS) dérivée de la souche Pasteur.

On calcule ensuite le taux de protection ( $DE_{50}$ ) conféré par le vaccin de référence et par le vaccin testé (adjuvé et non adjuvé). Cette étude est réalisée en trois principales étapes :

1. **Primo vaccination V1** : Jour 0 par voie intra-péritonéale (I/P)
2. **Seconde vaccination V2** : Jour 7 par voie intra-péritonéale (I/P)
3. **Epreuve de Challenge avec le virus (CVS)** : Jour 14 par voie intra-crâniale (I/C)



**Figure 7 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental**

### **II.3.2. Protocole expérimental**

Une population animale composée de 480 souris a été réservée par cette enquête de type analytique. La répartition suivante des souris a été faite, 30 souris dans le groupe témoins, 50 souris dans le groupe avec vaccin référence et 400 souris réparties en 8 lots ont été testées par un vaccin adjuvé et non adjuvé voir tableau 3.

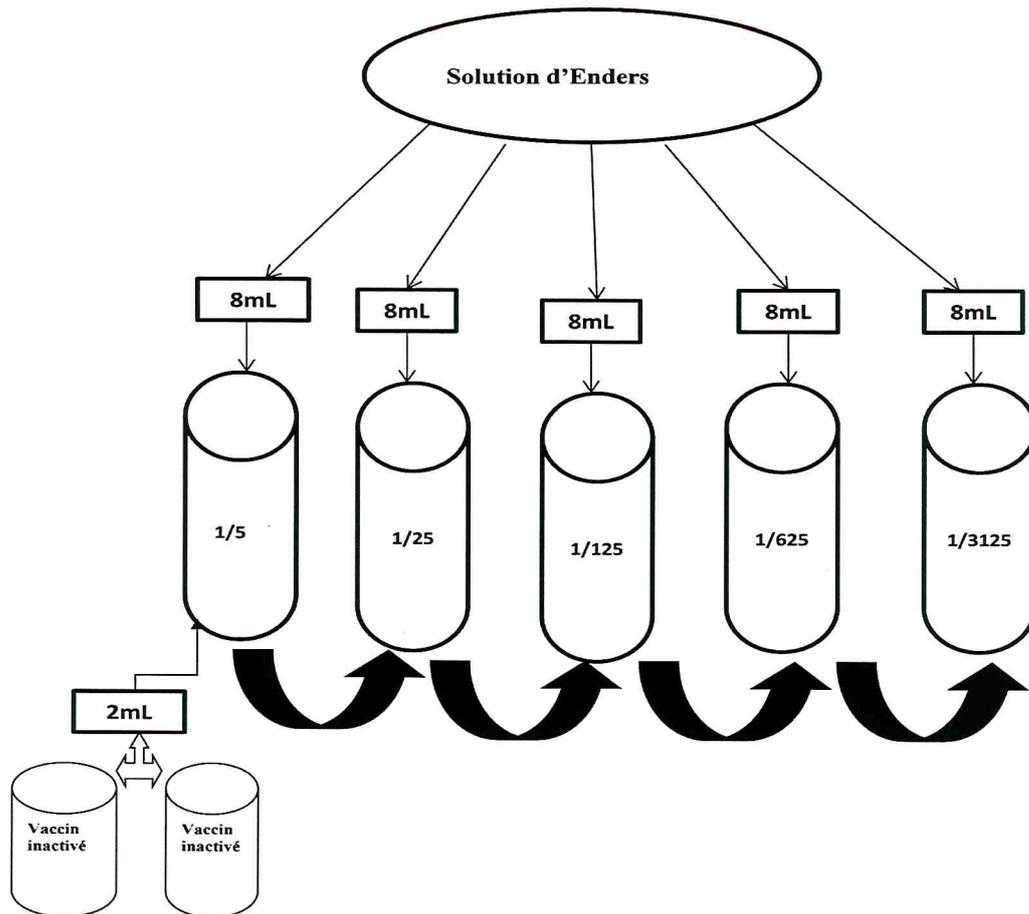
**Tableau 3** : Répartition des différents lots de souris dans notre expérimentation

N° du lot	Nombre de Souris	Sans adjuvant	Avec adjuvant
S198	100	50	50
S200	100	50	50
S203	100	50	50
S204	100	50	50
S188 REF	50	50	00
Témoins	30	00	00
<b>Total</b>	<b>480</b>	<b>250</b>	<b>200</b>

### II.3.3. Préparation des dilutions du vaccin

#### ➤ Dilutions de vaccin non adjuvé

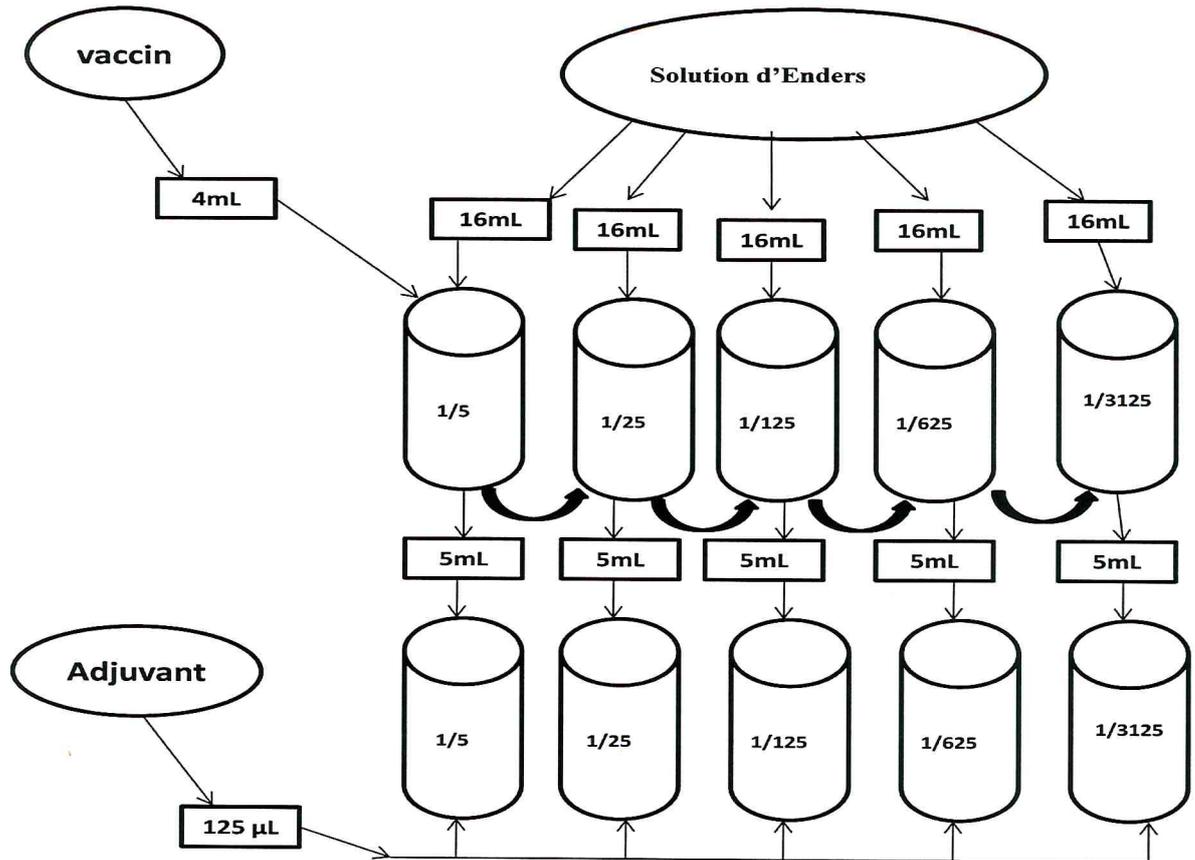
- Diluer 4 mL de sérum de veau foetal dans 200 mL de la solution d'Enders,
- Préparer une série de 5 tubes en verres stériles contenant 8 mL du SVF dilué,
- Dissoudre les pastilles avec la solution d'Enders introduite dans les flacons à l'aide d'une seringue,
- Homogénéiser la solution vaccinale à l'aide d'un vortex puis prélever 2 mL et les diluer dans les 8 mL contenus dans le premier tube, pour obtenir une dilution au 1/5.
- Procéder à des dilutions successives jusqu'à l'obtention d'une dernière dilution à 1/3125
- Répéter les mêmes étapes pour chaque lot.



**Figure 8: Schéma explicatif des dilutions du vaccin à virus inactivés lyophilisés non adjuvé**

➤ **Dilutions de vaccin avec adjuvant**

- Diluer 4 mL de sérum de veau foetal dans 200 mL de la solution d'Enders,
- Préparer 1 série de 5 tubes en verres stériles contenant 16 mL du SVF dilué,
- Homogénéiser la solution vaccinale à l'aide d'un vortex puis prélever 4mL et les diluer dans les 16 mL contenus dans le premier tube, pour obtenir une dilution au 1/5,
- Procéder à des dilutions successives jusqu'à l'obtention d'une dernière dilution à 1/3125,
- A partir des dilutions précédentes prélever 5mL de chaque dilution et ajouter 125µL d'adjuvant polysaccharidique dans chaque tube à l'aide de micropipettes P1000,
- Répéter les mêmes étapes pour chaque lot.



**Figure 9: Schéma explicatif des dilutions du vaccin à virus inactivés lyophilisés avec un adjuvant polysaccharidique**

### **II.3.4. Primo et seconde vaccination (inoculation aux souris)**

Pour chaque lot dix souris sont inoculées par voie intra-péritonéale avec 0.5 mL de chacune des dilutions à l'aide d'une seringue à 2.5 mL, on aura donc un total de 50 souris inoculées pour chaque vaccin.

Si l'on tient à employer qu'une seule seringue pour inoculer les souris, il faut inoculer d'abord les animaux qui reçoivent le vaccin le plus dilué puis ceux qui reçoivent les vaccins successivement plus concentrés.

Il est indispensable de séparer les animaux par groupes correspondants aux différentes concentrations des vaccins (utilisation des cages à souris ; chacune comportant le numéro du lot de vaccin, la dilution et la date de l'inoculation).



**Figure 10 : Inoculation du vaccin par voie intra-péritonéale (Photo personnel)**

### **II.3.5. Préparation des diverses dilutions du virus CVS**

Toutes les souris (les 480 souris) sont éprouvées par voie intracérébrale 14 jours après administration de la première dose de vaccin.

Une ampoule de virus CVS est décongelée rapidement sous l'eau du robinet et diluée à 1/10 avec le diluant (SVF à 2% dans l'eau distillé).

On prépare des dilutions  $10^{-4.3}$ ,  $10^{-5.3}$ ,  $10^{-6.3}$ ,  $10^{-7.3}$  à partir de dilution de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ . Il est recommandé de maintenir les dilutions du matériel d'épreuve dans un bain d'eau glacée pendant toute la durée du test, cela afin d'éviter une baisse du titre

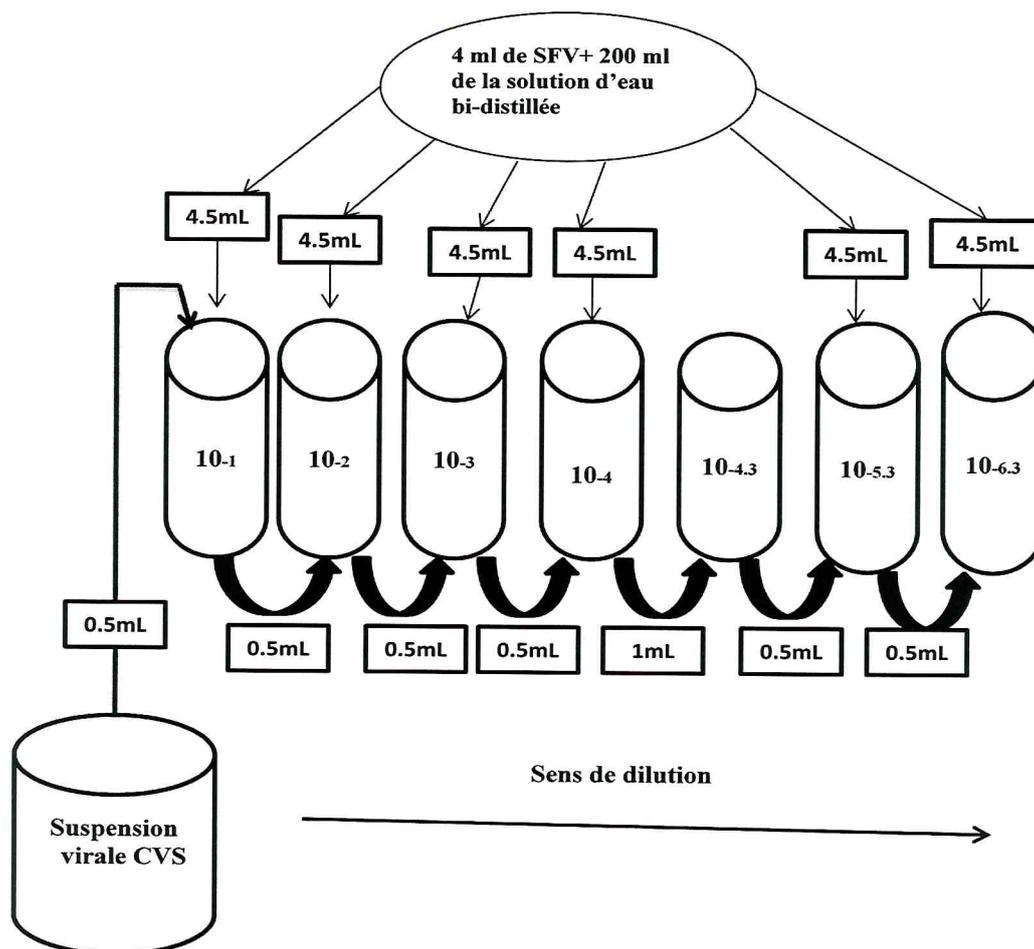


Figure 11: Schéma explicatif des dilutions de la suspension virale d'épreuve

### II.3.6. Epreuve de challenge avec le virus CVS (inoculation aux souris)

400 souris immunisées dont :

200 souris : par le vaccin adjuvé

200 souris : par le vaccin non adjuvé

50 souris : par le vaccin de référence

Ces 450 souris sont toutes éprouvées avec une dilution de virus qui contient une dilution de  $10^{-4.30}$ . Quand les souris immunisées ont été inoculées avec la dose d'épreuve, un groupe de 10 souris témoins est inoculé avec la même dose de virus ( $10^{-4.30}$ ). Deux dilutions de ( $10^{-5.30}$  et  $10^{-6.30}$ ) sont préparées pour être injectés aux 20 autres souris témoins (chaque groupe de dix souris correspond à une dilution) pour la détermination du titre réel obtenu lors de ce travail.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

Une seule seringue peut être utilisée pour éprouver toutes les souris immunisées et un groupe de témoins, une autre seringue est employée pour éprouver le reste des témoins. Il est recommandé d'injecter d'abord la dilution à  $10^{-6.30}$ , puis la dilution à  $10^{-5.30}$ ; le volume inoculé est 0.03 mL.



**Figure 12: Inoculation du virus CVS par voie intracérébrale (IC) (Photo personnel)**

### **II.4. Lecture des fiches cliniques**

Un dispositif quotidien de surveillance est mis en place pour suivre et noter tous les signes cliniques émanant des souris durant toute la période d'expérimentation. Ces fiches sont en effet, remplies suivant des observations quotidiennes effectuées tous les matins. Seuls les mortalités enregistrées au delà de 5<sup>ème</sup> jour de l'expérimentation et celles précédées par des signes (paralysie et convulsion) de rage sont considérées dues à la rage.

### **II.5. Calcul de DE<sub>50</sub> et la valeur antigénique**

#### **🚩 Calcul de DE<sub>50</sub>**

Les doses effectrices à 50% ont été calculées, tant pour le vaccin de référence et le vaccin d'expertise, selon la méthode de Spearman et Karber. Ainsi, la dilution de vaccin qui protégera 50% des souris est définie comme DE<sub>50</sub>; son calcul en effet, se fait comme suit:

1. Noter le log<sub>10</sub> de l'inverse de la plus faible dilution de vaccin pour laquelle toutes les souris survivront,

2. Déterminer le nombre total de souris survivantes à la dilution définie à l'étape 1 et à toutes les dilutions supérieures,
  3. Lire dans la table numérique correspondant au facteur de dilution et au nombre de souris utilisées, la valeur numérique attribuée au nombre de souris positives déterminés à l'étape 2,
- ✓ Additionner les valeurs obtenues en 1 et en 3, ce total représente le log<sub>10</sub> de l'inverse de la dilution au point 50%.

### **Calcul de la valeur antigénique (VA)**

Le calcul de la valeur antigénique a été réalisé selon le protocole ci-dessous :

- ✓  $DE_{50}(\text{expertise}) - DE_{50}(\text{référence}) = X$
- ✓  $\text{Anti log } X = Y$
- ✓  $VA(\text{expertise}) = Y \times VA(\text{référence}) = VA(\text{expertise})$
- **Pour un vaccin efficace la VA (expertise) doit être > 0.3**

## **III. Résultats et discussion**

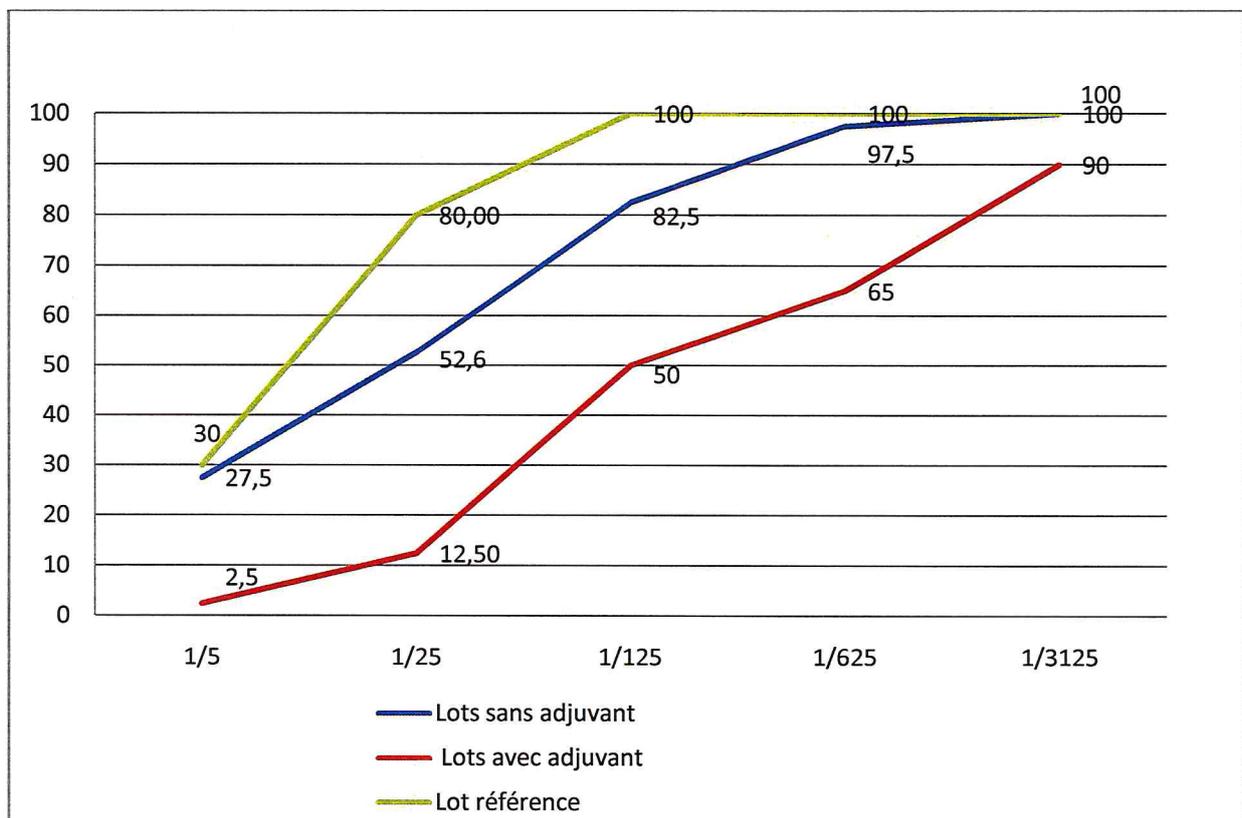
### **III.1. Impact de la dilution de vaccin sur le taux de mortalité**

Les *Lyssavirus* peuvent utiliser différents composants de la surface des cellules pour pénétrer dans la cellule hôte, incluant les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine, les récepteurs au facteur de croissance des nerfs à faible affinité et des gangliosides (Rupprecht *et al.*, 2002). L'adjuvant polysaccharidique dans un vaccin, est parmi les adjuvants qui constituent un groupe de substances ayant pour but d'aider la réponse immunitaire en stimulant notamment la réponse immunitaire innée. A la lecture des résultats de tableau 4, on note une variabilité des dilutions qui s'accompagnent de la mort de plus 50% de souris. La dilution 1/25<sup>ème</sup> de vaccin rabique n'a pas permis de protéger 50% des souris appartenant aux lots de référence et les lots vaccinés par le vaccin rabique non adjuvé. La dilution 1/25<sup>ème</sup> est, par contre, associée à la mort de 12,5% des souris vaccinées par le vaccin rabique adjuvé. On observe une mortalité supérieure à 50% sur le groupe testés par un vaccin rabique adjuvé à la dilution 1/125<sup>ème</sup>.

**Tableau 4 : Taux de mortalité en fonction de type de vaccin et de la dilution**

Dilution de vaccin	Lot référence			Lots sans adjuvant			Lots avec adjuvant		
	No.	M	%M	No.	M	%M	No.	M	%M
1/5	10	3	30	40	11	27,5	40	1	2.5
1/25	10	8	<b>80</b>	38	20	<b>52,6</b>	40	5	12.5
1/125	10	10	100	40	33	82,5	40	20	<b>50.0</b>
1/625	10	10	100	40	39	97,5	40	26	65.0
1/3125	10	10	100	40	40	100	40	36	90.0

No : Nombre de souris ; M : Mortalité ; %M : Taux de mortalité



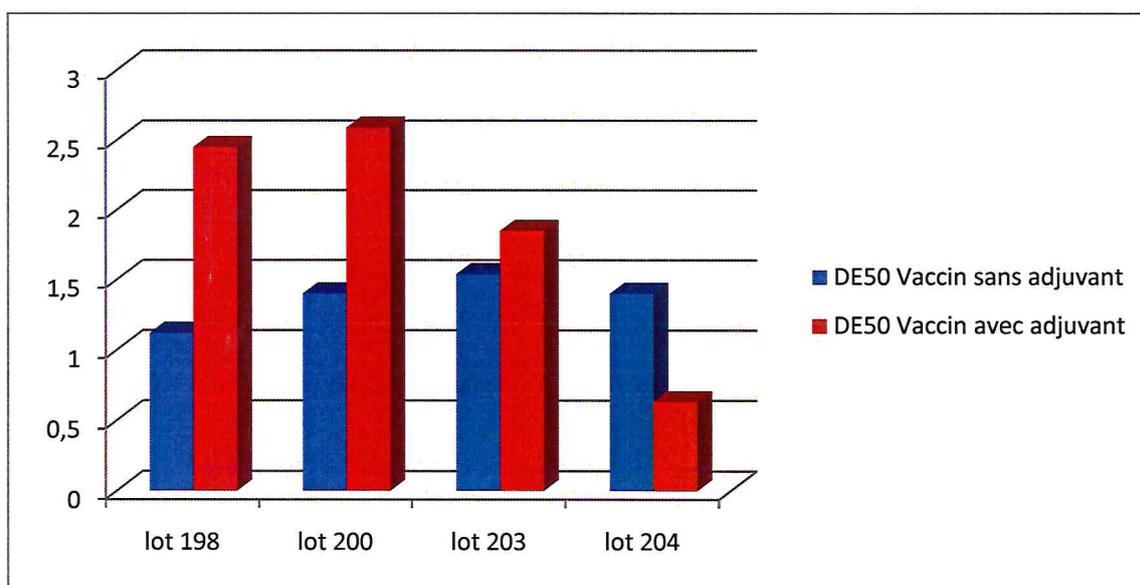
**Figure 13 : Variation des taux de mortalité en fonction de type de vaccin et de la dilution**

### **III.2. Impact de l'adjuvant sur la dose effectrice**

Le calcul des doses effectrices 50% des lots vaccinés avec un vaccin rabique non adjuvé et des lots vaccinés par un vaccin rabique adjuvé a permis de dresser le tableau 5 et la figure 14.

**Tableau 5: Détermination des dose effectrices 50 (DE<sub>50</sub>) des vaccins adjuvé et non adjuvé**

<b>Lot</b>	<b>DE<sub>50</sub> Vaccin sans adjuvant</b>	<b>DE<sub>50</sub> Vaccin avec adjuvant</b>
Lot 198	1.12	2.45
Lot 200	1.4	2.59
Lot 203	1.54	1.85
Lot 204	1.4	0.63



**Figure 14 : Histogramme de variation des DE<sub>50</sub> en fonction des lots et de type de vaccin**

Il a été rapporté que l'adjuvant polysaccharidique permet la stimulation de l'immunité au niveau des muqueuses, en raison notamment de leur capacité de perméabiliser les muqueuses aux antigènes (Van der Lubben et *al.*, 2001).

L'étude comparative des doses effectrices 50, révèle une nette supériorité des DE<sub>50</sub> dans les lots vaccinés par un vaccin rabique adjuvé. On calcule en effet un ratio non adjuvé/adjuvé de 1/3 nettement en faveur de l'adjuvant polysaccharidique voir Figure 14.

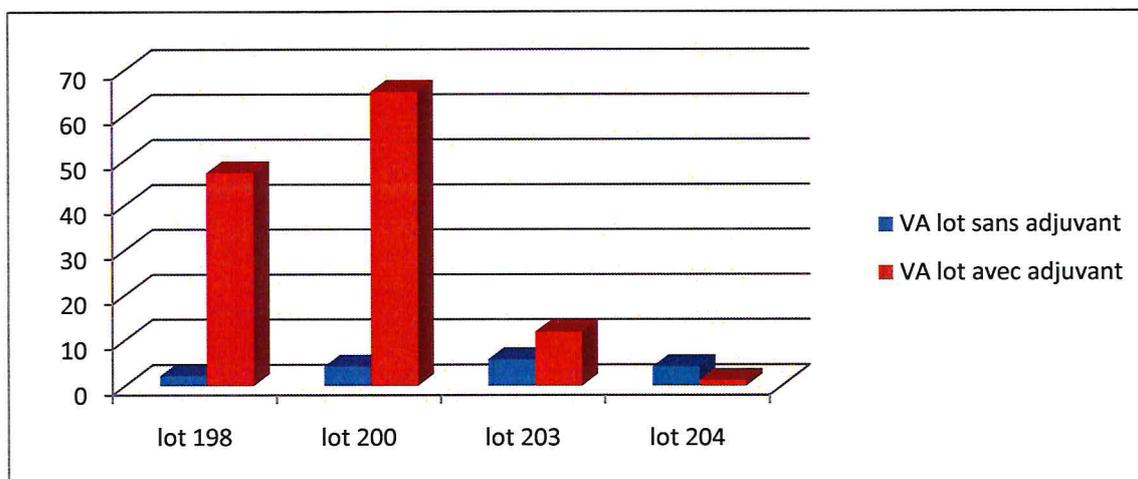
### **III.3. Valeurs antigénique et efficacité de l'adjuvant**

Chaque adjuvant est d'abord caractérisé par sa capacité d'activer sélectivement les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) de type Th2 ou Th1, qui correspondent aux deux grandes voies que peut emprunter la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Cette dichotomie a été mise à jour chez la souris en comparant les effets des sels d'aluminium et de l'ACF (L'Adjuvant Complet de Freund), les premiers induisant une réponse de type Th2 et les seconds une réponse de type Th1 (Grun et Maurer, 1989).

Suivant le calcul des valeurs antigéniques des vaccins adjuvé et non adjuvé, on note que les deux types de vaccins jouissent d'une efficacité remarquable. Ils manifestent en effet, des valeurs antigéniques supérieures à 0.3. A l'exception de lot 204 où la valeur antigénique de vaccin non adjuvé est supérieure à la valeur antigénique de vaccin adjuvé, dans les trois autres lots on note que les valeurs antigéniques enregistrées dans les lots traités par un vaccin adjuvé sont nettement supérieures à celles des lots traités par un vaccin non adjuvé.

**Tableau 6 : Comparaison des valeurs antigéniques des vaccins adjuvé et non adjuvé**

N° Lot	VA Lot sans adjuvant	VA lot avec adjuvant
Lot 198	2.20	47.22
Lot 200	4.2	65.18
Lot 203	5.8	11.86
Lot 204	4.2	1.18



**Figure 15: Variation des valeurs antigéniques des vaccins en fonction des lots et de la présence de l'adjuvant**

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

---

Un adjuvant peut aussi favoriser des aspects plus particuliers de la réponse immunitaire, comme par exemple la réponse d'hypersensibilité retardé ou la réponse à lymphocytes T cytotoxiques, qui correspondent à deux paramètres de l'immunité à médiation cellulaire, ou encore la production d'IgA sécrétoires dans un contexte Th2. Il peut aussi influencer l'isotype des immunoglobulines produites. La dichotomie Th1/Th2, qui repose sur les observations faites chez la souris, n'est pas toujours aussi nette chez les autres espèces. Néanmoins, étant donné que les nouveaux adjuvants sont d'abord testés chez la souris, cette distinction reste largement utilisée (Jensen et *al.*, 1998).

L'étude de l'efficacité de l'adjuvant polysaccharidique chez les autres espèces est un préalable pour mieux évaluer son innocuité et son efficacité. Il est indispensable, par ailleurs d'évaluer la réponse immunitaire chez les lots traités que ce soit avec un vaccin non adjuvé qu'un vaccin adjuvé.

# Conclusion

## Conclusion

La vaccination est le moyen de prophylaxie classiquement utilisé pour la lutte contre la rage. Les vaccins à virus inactivé lyophilisé, jouissent d'utilisation fréquente en pratique, que ce soit vétérinaire qu'en santé publique, ils permettent une immunisation efficace et durable vis-à-vis de la maladie. Il est notable que la réponse immunitaire pourrait être boostée en associant un adjuvant au vaccin. L'adjuvant polysaccharidique est parmi les adjuvants qui constituent un groupe de substances ayant pour but d'aider la réponse immunitaire en stimulant notamment la réponse immunitaire innée.

Notre étude portant sur l'effet d'un adjuvant polysaccharidique sur la valeur antigénique d'un vaccin antirabique tissulaire sur des souris a montré une nette supériorité protectrice par rapport au vaccin non adjuvé. En effet, la dilution 1/25<sup>ème</sup> de vaccin rabique n'a pas permis de protéger 50% des souris appartenant aux lots de référence ni aux lots vaccinés par le vaccin rabique non adjuvé. Cette dilution par contre, a engendré la mort de seulement 12,5% des souris vaccinées par le vaccin rabique adjuvé.

Trois des quatre lots vaccinés par un vaccin rabique adjuvé ont montré des DE<sub>50</sub> supérieures à celles des lots traités par un vaccin non adjuvé.

Suivant le calcul de la valeur antigénique, il s'avère que tous les vaccins sont efficace (>0.3) mais la valeur du vaccin adjuvé est beaucoup plus supérieure que la valeur du vaccin non adjuvé ce qui nous permet de conclure que l'adjuvant polysaccharidique a donné une amélioration de la réponse vaccinale vis-à-vis de la rage chez les souris.

L'étude de l'efficacité de l'adjuvant polysaccharidique chez les autres espèces est un préalable pour mieux évaluer son innocuité et son efficacité. Il est indispensable, par ailleurs d'évaluer la réponse immunitaire chez les lots traités que ce soit avec un vaccin non adjuvé qu'un vaccin adjuvé.

# Références

## Références bibliographiques

**Abdi D, Arifi M. 2006.** Situation de la rage dans le monde et en Algérie. Thèse de doctorat en vétérinaire 48p

**Abelseth MK. 1969.** An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. *Can. Vet. J.* 5 : 279

**Albertini AAV, Ruigrok RWH, Blondel D. 2011.** Rabies Virus Transcription and Replication. *In* : Advances in Virus Research. Elsevier Inc. 79, Chapter 1:1-18

**Andral & Blancou J. 1982.** La rage. Nouveaux développements en matière de vaccination, *Rev.sci.tech.Off.int. Epiz.* 1(4) : 895-930.

**Aubert MFA, Andral L, Blancou J. 1981.** Contrôle d'activité des vaccins antirabiques inactivés. Etude critique du test des N.I.H. par un modèle expérimental dit «Test périphérique». *J. Biol. Standard.* 9: 35-43

**Barrat J, Rollin PE. 1985.** Les symptômes de la rage et son diagnostic. *In* : Pasteur et la Rage. Paris, Informations Techniques des Services Vétérinaires. 303-310

**Blancou J, Milward P, Toma B, Willemart J.P. 1981.** La vaccination antirabique de carnivores sous corticothérapie. *Rec. Méd. Vét.* 157 (9) : 651-657.

**British Pharmacopoeia Veterinary. 1977.** University Press, Cambridge

**Bussereau F, Blancou J, Aubertm FA. 1981.** Characteristics of temperature sensitive mutants in mice and foxes. *Vth Int.Cong.Virol.*, 158, W 12/01.

**Chantal J, Blancou J. 1985.** Le virus rabique. *In*: Pasteur et la Rage. Paris, Informations Techniques des Services Vétérinaires. 281-292

**Cynthia M, BA MA. 2008.** Le manuel vétérinaire Merck 3<sup>ème</sup> édition française d'après la 9<sup>ème</sup> édition anglaise, 13, rue Chapon. Paris, 1067-1071.

**Dahmani F, Hami B. 1996.** Contrôle d'activité par le test N.I.H. du vaccin rabique souriceau à usage humain. Contribution à un essai de modification du test N.I.H. Mémoire d'ingénieur d'état en génie-biologique. 50p

**Direction générale de santé. 2008.** Guide des vaccinations. Édition 2012. Saint-Denis: Inpes, coll. Varia, 2012 : 448 p.

**Fekadu M, Shaddock JH. 1984.** Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. *Amer. J. Vet. Res.* 45 (4):724-729

**Grun JL, Maurer PH. 1989.** Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cell. Immunol.* (121):134-145

**Haut Conseil de la santé publique. 2013.** Vaccination antirabique préventive, traitement post-exposition et suivi sérologique des personnes régulièrement exposées au virus de la rage (voyageurs, professionnels, chiroptérologues), Rapport ,7-8

**Hendekli CM. 2005.** Current therapies in rabies. *Arch Viro*, I 150 : 1047-57

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/fr/> consulté 21/04/2015

**Iwasaki Y. 1985.** Le virus rabique : morphologie. In : Pasteur et la Rage. Paris, Informations Techniques des Services Vétérinaires. 123 S-129 S

**Iwasaki Y. 1985.** Le virus rabique : morphologie. In: Pasteur et la Rage. Paris, Informations Techniques des Services Vétérinaires. 123 S-129 S

**Jensen FC, Savary JR, Diveley JP, Chang JC. 1998.** Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 32: 173-186

**Kaplan M, Koprowski H. 1974.** La rage. Techniques de laboratoire. O.M.S., Genève.

**Koprowski H, Black J. 1954.** Studies on chick embryo adapted rabies virus. VII. Immunological responses of animals to vaccination with H.E.P. Flury Strain. *J. Immunol.* 72: 503-520.

**Koprowski H, Cox H.R. 1948.** Studies on chick embryo adapted rabies virus. I. Culture characteristics and pathogenicity. *J. Immunol.* 60: 533-554

**Lepine P, Gamet A. 1969.** Rage « les maladies animales à virus » pp : 22-29

**Lepine P, Gamet A. 1969.** Rage « les maladies animales à virus » pp. 22-29

**Les équipes de l'Institut Pasteur, (2013).**  
<https://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/presse-old/fiches-sur-les-maladies-infectieuses/rage> consulter le : 20/04/2015

**Metallaoui A. (2009).** Renforcement de la surveillance et des systèmes d'alerte pour la fièvre catarrhale ovine, la fièvre du Nil occidental et la rage au Maroc, en Algérie et en Tunisie, Projet GCP/RAB/002/FRA, 18-20

**Peigue-Lafeuille H. 2006.** Virus de la rage, Biologie clinique (90-55-0165) ; Elsevier Masson SAS .12p

**Rosset R. 2003.** Pasteur et les vétérinaires. *Bull. Soc. Fr. Hist. Méd. Sci. Vét.* 2 (2): 1-25

**Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. 2002.** Rabies re-examined. *Lancet Infect. Dis.* 2: 327-343

**Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. 2002.** Rabies re-examined. *Lancet Infect. Dis.* 2:327-343

**Rupprecht CE., Hanlon CA. & Hemachudha T. 2002.** Rabies re-examined. *Lancet Infect. Dis.* 2 : 327-343

**Soufi. 2008.** Les régions du nord et des hauts plateaux plus exposés à la rage à cause de l'humidité. Journal Elmoudjahid.

**Soulebotj P. 1980.** Prophylaxie médicale de la rage vétérinaire. *Bull. Soc. Sci.Vét. Méd. Comp.* 82(1): 39-47

**Srinivasan A, Burton EC, Kuehnert MJ, Rupprecht C, Sutker WL, Ksiazek TG et al. 2005.** Transmission of Rabies Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* 352(11):1103-1111

**Steele JH. 1975.** History of Rabies in The natural history of rabies, Vol. 1, chap. 1, 1-29, Ed by Baer G.M., Academic Press, New York.

**Thraenhart O. 1989.** Evaluation de l'innocuité et de l'activité des vaccins antirabiques *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 8 (4): 845-847

**Toma B. 2006.** Polycopiés rédigés de manière concertée par les enseignants de maladies contagieuses des quatre Ecoles nationales vétérinaires françaises, à l'usage des étudiants vétérinaires.

**Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. 1986.** Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV. *Nucl. Acids Res.* 14 :2671-2683.

**Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rougeon F. 1986.** Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV. *Nucl. Acids Res.* 14 :2671-2683.

**Tsiang H. 1985.** Pathogénie de la rage. In : Pasteur et la Rage. Paris, Informations Techniques des Services Vétérinaires. 145S-151S

**Van Der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. 2001.** Chitosan for mucosal vaccination. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 52: 139-144

**Vermout S, Denis M, Losson B, Mignon B. 2003.** Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination, *Ann. Méd. Vét.* 147 : 393-401.

**Wandeler A, Wachendörfer G, Förster U, Krekel H, Müller J, Steck F. 1974.** Rabies in Wild Carnivores in Central Europe. II. Virological and Serological Examinations. *Zbl. Vet. Med.* 21:757-764

**WHO Technical Report Series. 2005.** WHO Expert Consultation on Rabies. First report. WHO Technical Report Series. 931:15-19

**WHO. 1980.** Report of consultation on rabies. Prevention and Control. W.H.O., Lyon, France, 10-12 March 1980, 43 pp

**WHO. 1996.** Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition, Meslin F.-X., Kaplan M.M. & Koprowski H., eds. WHO, Geneva, Switzerland

**WHO. 2014.** Centre des médias Rage Aide-mémoire N°99 Septembre 2014

**Wiktor TJ. 1973.** Tissue culture methods in Laboratory techniques in rabies, chap. 9, 101-123, Ed by M.M. Kaplan and H. Koprowski, third edition, W.H.O., Geneva.

# **ANNEXES**

## ANNEXE

**Tableau 1 : Lot 188 de référence**

LOT 188				
Dilution	Nombre de Souris	Survivant	Mortalité	Taux de mortalité
1/5	10	7	3	30
1/25	10	2	8	80
1/125	10	0	10	100
1/625	10	0	10	100
1/3125	10	0	10	100

### Calcul de la DE<sub>50</sub>

#### LOT188

VA de référence calculée = 1.88

- ✓ La dilution la plus faible de vaccin pour laquelle toutes les souris survivent est 1/5
- ✓ Le log<sub>10</sub> de l'inverse de la plus faible est  $\log_5 = 0.7$
- ✓ Nombre total de souris survivantes est 10
- ✓ D'après la table numérique correspondant au facteur de dilution et au nombre de souris on utilise la valeur numérique attribuée au nombre de souris positives → 0.35
- ✓  $0.7 + 0.35 = 1.05$
- ✓ **DE<sub>50</sub> = 1.05**

**Tableau 2: Lot 198 et lot 198A**

Dilution	LOT 198			LOT 198A		
	Nbre de souris	Mortalité	Taux de mortalité	Nbre de souris	Mortalité	Taux de mortalité
1/5	10	2	20	10	0	0
1/25	8	5	62.5	10	0	0
1/125	10	9	90	10	3	30
1/625	10	10	100	10	4	40
1/3125	10	10	100	10	8	80

## Calcul de la $DE_{50}$

### LOT198

- $DE_{50}$ 
  - ✓ La dilution la plus faible de vaccin pour laquelle toutes les souris survivent est 1/5
  - ✓ Le  $\log_{10}$  de l'inverse de la plus faible est  $\log 5 = 0.7$
  - ✓ Nombre total de souris survivantes est 11
  - ✓ la valeur numérique attribuée à 11 souris survivantes d'après la table est  $\rightarrow 0.42$
  - ✓  $0.7 + 0.42 = 1.12$
  - ✓  $DE_{50} = 1.12$
- VA
  - ✓  $DE_{50}(\text{expertise}) - DE_{50}(\text{référence}) = X$
  - ✓  $1.12 - 1.05 = 0.07$
  - ✓  $\text{Anti log } 0.07 = 1.17$
  - ✓  $VA(\text{expertise}) = 1.17 \times VA(\text{référence}) = 1.17 \times 1.88 = 2.20$
  - ✓  $VA = 2.20$  la VA (expertise) est  $> 0.3$  le vaccin est efficace

### LOT198A

- $DE_{50}$ 
  - ✓ La dilution la plus faible de vaccin pour laquelle toutes les souris survivent est 1/25
  - ✓ Le  $\log_{10}$  de l'inverse de la plus faible est  $\log 25 = 1.4$
  - ✓ Nombre total de souris survivantes est 20
  - ✓ la valeur numérique attribuée à 11 souris survivantes d'après la table est  $\rightarrow 1.05$
  - ✓  $1.4 + 1.05 = 2.45$
  - ✓  $DE_{50} = 2.45$
- VA
  - ✓  $DE_{50}(\text{expertise}) - DE_{50}(\text{référence}) = X$
  - ✓  $2.45 - 1.05 = 1.4$
  - ✓  $\text{Anti log } 1.4 = 25.11$
  - ✓  $VA(\text{expertise}) = 25.11 \times VA(\text{référence}) = 25.11 \times 1.88 = 47.22$
  - ✓  $VA = 47.22$  la VA (expertise) est  $> 0.3$  le vaccin est efficace

**Tableau 3: Lot 200 et 200A**

Dilution	LOT 200			LOT 200 A		
	Nbre de souris	Mortalité	Taux de mortalité	Nbre de souris	Mortalité	Taux de mortalité
1/5	10	2	20	10	0	0
1/25	10	3	30	10	0	0
1/125	10	7	70	10	2	20
1/625	10	10	100	10	5	50
1/3125	10	10	100	10	8	80

**Calcul de la DE<sub>50</sub>**

**LOT200**

• **DE<sub>50</sub>**

- ✓ La dilution la plus faible de vaccin pour laquelle toutes les souris survivent est 1/5
- ✓ Le log<sub>10</sub> de l'inverse de la plus faible est log<sub>5</sub> = 0.7
- ✓ Nombre total de souris survivantes est 15
- ✓ la valeur numérique attribuée à 15 souris survivantes d'après la table est → 0.7
- ✓  $0.7 + 0.7 = 1.4$
- ✓ **DE<sub>50</sub> = 1.4**

• **VA**

- ✓ DE<sub>50</sub> (expertise) – DE<sub>50</sub> (référence) = X
- ✓  $1.4 - 1.05 = 0.35$
- ✓ Anti log 0.35 = 2.23
- ✓ VA (expertise) = 2.23 × VA (référence) = 2.23 × 1.88 = 4.2

**VA=4.2** la VA (expertise) est > 0.3 le vaccin est efficace

### LOT200A

- **DE<sub>50</sub>**
  - ✓ La dilution la plus faible de vaccin pour laquelle toutes les souris survivre est 1/25
  - ✓ Le log<sub>10</sub> de l'inverse de la plus faible est log<sub>25</sub>= 1.4
  - ✓ Nombre total de souris survivantes est 22
  - ✓ la valeur numérique attribuée à 22 souris survivantes d'après la table est → 1.19
  - ✓ 1.4+1.19 = 2.59
  - ✓ **DE<sub>50</sub>= 2.59**
- **VA**
  - ✓ DE<sub>50</sub> (expertise) – DE<sub>50</sub> (référence) = X
  - ✓ 2.59-1.05 = 1.54
  - ✓ Anti log 1.54 = 34.67
  - ✓ VA (expertise) = 34.67× VA (référence) = 34.67 × 1.88 = 65.18
  - ✓ **VA=65.18 la VA (expertise) est > 0.3 le vaccin est efficace**

**Tableau 4: Lot 203 et lot 203A**

Dilution	LOT 203			LOT 203 A		
	Nbre de souris	Mortalité	Taux de mortalité	Nbre de souris	Mortalité	Taux de mortalité
1/5	10	2	20	10	0	0
1/25	10	4	40	10	0	0
1/125	10	7	70	10	6	60
1/625	10	9	90	10	7	70
1/3125	10	10	100	10	10	100

### Calcul de la DE<sub>50</sub>

#### LOT203

- **DE<sub>50</sub>**
  - ✓ La dilution la plus faible de vaccin pour laquelle toutes les souris survivre est 1/5
  - ✓ Le log<sub>10</sub> de l'inverse de la plus faible est log<sub>5</sub>= 0.7
  - ✓ Nombre total de souris survivantes est 7
  - ✓ la valeur numérique attribuée à 7 souris survivantes d'après la table est → 0.84
  - ✓ 0.84+0.7 = 1.54
  - ✓ **DE<sub>50</sub>= 1.54**

- VA

- ✓  $DE_{50}(\text{expertise}) - DE_{50}(\text{référence}) = X$

- ✓  $1.54 - 1.05 = 0.49$

- ✓  $\text{Anti log } 0.49 = 3.09$

- ✓  $VA(\text{expertise}) = 3.09 \times VA(\text{référence}) = 3.09 \times 1.88 = 5.8$

**VA=5.8** la VA (expertise) est > 0.3 le vaccin est efficace

**LOT203A**

- $DE_{50}$

- ✓ La dilution la plus faible de vaccin pour laquelle toutes les souris survivent est 1/25

- ✓ Le  $\log_{10}$  de l'inverse de la plus faible est  $\log_{10} 25 = 1.4$

- ✓ Nombre total de souris survivantes est 12

- ✓ la valeur numérique attribuée à 12 souris survivantes d'après la table est  $\rightarrow 0.45$

- ✓  $1.4 + 0.45 = 1.85$

- ✓  **$DE_{50} = 1.85$**

- VA

- ✓  $DE_{50}(\text{expertise}) - DE_{50}(\text{référence}) = X$

- ✓  $1.85 - 1.05 = 0.8$

- ✓  $\text{Anti log } 0.8 = 6.30$

- ✓  $VA(\text{expertise}) = 6.30 \times VA(\text{référence}) = 6.30 \times 1.88 = 11.86$

- ✓ **VA=11.86** la VA (expertise) est > 0.3 le vaccin est efficace

**Tableau 5: Lot 204 et Lot 204 A**

Dilution	LOT 204			LOT 204 A		
	Nbre de souris	Mortalité	Taux de mortalité	Nbre de souris	Mortalité	Taux de mortalité
1/5	10	5	50	10	1	10
1/25	10	8	80	10	5	50
1/125	10	10	100	10	9	90
1/625	10	10	100	10	10	100
1/3125	10	10	100	10	10	100

## Calcul de la DE<sub>50</sub>

### LOT204

- DE<sub>50</sub>

- ✓ La dilution la plus faible de vaccin pour laquelle toutes les souris survivre est 1/5
- ✓ Le log<sub>10</sub> de l'inverse de la plus faible est log<sub>5</sub> = 0.7
- ✓ Nombre total de souris survivantes est 5
- ✓ la valeur numérique attribuée à 5 souris survivantes d'après la table est → 0.7
- ✓  $0.7+0.7 = 1.4$

**DE<sub>50</sub> = 1.4**

- VA

- ✓  $DE_{50}(\text{expertise}) - DE_{50}(\text{référence}) = X$
- ✓  $1.4 - 1.05 = 0.35$
- ✓  $\text{Anti log } 0.35 = 2.23$
- ✓  $VA(\text{expertise}) = 2.23 \times VA(\text{référence}) = 2.23 \times 1.88 = 4.20$

**VA = 4.2** la VA (expertise) est > 0.3 le vaccin est efficace

### LOT204A

- DE<sub>50</sub>

- ✓ La dilution la plus faible de vaccin pour laquelle toutes les souris survivre est 1/5
- ✓ Le log<sub>10</sub> de l'inverse de la plus faible est log<sub>5</sub> = 0.7
- ✓ Nombre total de souris survivantes est 10
- ✓ la valeur numérique attribuée à 10 souris survivantes d'après la table est → 0.15
- ✓  $0.7+0.15 = 0.63$

- ✓ **DE<sub>50</sub> = 0.63**

- VA

- ✓  $DE_{50}(\text{expertise}) - DE_{50}(\text{référence}) = X$
- ✓  $0.85 - 1.05 = -0.2$
- ✓  $\text{Anti log } -0.2 = 0.63$
- ✓  $VA(\text{expertise}) = 0.63 \times VA(\text{référence}) = 0.63 \times 1.88 = 1.18$

**VA = 1.18** la VA (expertise) est > 0.3 le vaccin est efficace