

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DEL'ENSEIGNEMENTS SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Saad Dahleb Blida1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des biotechnologies
Laboratoire protection valorisation des ressources agrobiologiques

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master II

Filière : Sciences biologiques

Option : biotechnologie microbienne

Thème :

**Adaptation du virus rabique souche LPS sur culture
cellulaire BSR (BHK-21)**

Réalisé par

Mlle Benrais Rim

&

Mme Tebiremt Meroua

Soutenu publiquement le 27/06/2019 devant le jury composé de :

Mme. Krimi Z.	Pr	U.S.D.Blida.1	Présidente
Mme. Belkahla H.	Pr	U.S.D.Blida.1	Promotrice
M. Khadir M.	Ts	I.P.Alger	Co promoteur
Mme. Ammad F.	Dr	U.S.D.Blida.1	Examinatrice

Promotion: 2014/2019

Remerciements

Tout d'abord nous tenons à remercier DIEU tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté de terminer ce travail.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères au corps professoral et administratif de l'Université Saad Dahleb Blida1, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance, notre haute considération et notre profond respect à notre promotrice Mme Belkahlia Hadjira le professeur de virologie à la faculté des sciences et de la nature et de vie à l'université Saad Dahleb Blida1, ses conseils et ses encouragements ont permis à ce travail d'aboutir. Ses capacités scientifiques et ses compétences étaient notre grand support.

Nous tenons à remercier à travers ces quelques lignes les nombreuses personnes qui ont contribué au succès de notre stage et qui, par la confiance, la patience et l'amitié qu'ils ont manifestées à notre égard.

Nous profitons de cette occasion pour adresser nos sincères remerciements à Monsieur Issad Mourad directeur de l'institut Pasteur annexe Kouba Alger et, qui nous a permis de collecter le matériel biologique nécessaire pour réaliser cette étude.

Nous tenons à remercier notre Co promoteur Monsieur Khadir Mouloud chef service de l'unité de production de vaccin antirabique IPA, qui nous a guidé et encouragé au cours de ce travail, également pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Enfin nos remerciements nous tenons à remercier également tout l'ensemble de l'équipe IPA, et toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

“Qui ne sait mettre sa volonté dans les choses, y met au moins un sens : cela revient à croire qu'une volonté s'y trouve déjà.”

Friedrich Nietzsche

Dédicaces

Rim

Je dédie ce mémoire à ma très chère mère qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour
moi

À mon père, ce travail est le fruit de son sacrifice qu'il a consenti pour mon éducation et ma
formation

À mon frère Saïd et mes chères sœurs Bouchra Yasmine et Malek, à ma grande mère Hadda
Boukemouche

À une personne qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles.

À mon binôme Tibiremt Maroua, à mes meilleurs amies najwa Bouchra soumia et Naima
Rania wafa et a tous mes proches.

À monsieur Bougherara Hamza, khorchef Ahmed et Bezzaz Youcef Islem

Maroua

Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes chers parents qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que dieux vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

Je dédie aussi ce travail à :

Mon mari Bougherara Hamza

Mon fils Youcef

Mon frère Hani, mes sœurs Choubaila, Ahlem, Souha et Maria

Toi Rim Benrais

Monsieur khorchef Ahmed

Tous mes amis, Tous ceux qui m'ont aidé lors de la réalisation de ce travail, merci à tous.

La rage est une maladie virale infectieuse des lyssavirus qui est presque toujours mortelle une fois que les symptômes cliniques sont apparus.

Vu que la rage est une maladie à prévention vaccinale. La vaccination est la stratégie la plus efficace et la plus rentable pour éviter la rage chez l'animal et l'homme; ce qui permet de réduire le nombre des décès imputables à la rage dans le monde. En Algérie, la prophylaxie de la rage est basée sur l'utilisation d'un vaccin tissulaire inactivé type Fuenzalida produit à partir de cerveaux des souris. Le présent travail a pour objet de faire adapter la souche vaccinale LPS sur un support cellulaire BSR. Quelques passages d'adaptation ont été réalisés afin d'étudier la permissivité des BSR vis-à-vis au *Rhabdovirus* et d'établir la cinétique de titre viral au cours des passages successifs par la technique de titrage.

Les résultats observés ont montré une permissivité et une augmentation du titre viral progressif au cours des passages d'adaptation. Cette étude ouvre des perspectives vers l'utilisation des lignées continues pour la production du vaccin antirabique.

Mots clés : Fuenzalida, souche LPS, cellules BSR., titrage, .

Adaptation of rabies virus strain LPS on BSR cell culture (BHK-21)

Rabies is an infectious viral disease of lyssavirus that is almost always fatal once clinical symptoms have appeared. Since rabies is a vaccine preventable disease. Vaccination is the most effective and cost-effective strategy for preventing rabies in animals and humans; which reduces the number of deaths attributable to rabies worldwide. In Algeria, rabies prophylaxis is based on the use of an inactivated tissue vaccine type Fuenzalida produced from brains of young mice.

The present work aims to adapt the vaccine strain LPS on a BSR cell support. Some adaptation passages were made to study the permissiveness of BSR vis-à-vis the rabdovirus and establish the kinetics of viral titer during successive passages by the titration technique. The results found show permissiveness and a gradual increase in viral titer during adaptation passages. This study opens perspectives for the use of continuous lines for the production of rabies vaccine.

Key words: Fuenzalida, Rabies, LPS strain, BSR cells. Mouse brains, rabdovirus, titration.

تكييف فيروس داء الكلب سلالة LPS على الخلايا (BSR)(BHK-21)

داء الكلب هو مرض فيروسي معدي من عائلة lyssavirus ، وهو دائماً ما يكون مميت بمجرد ظهور الأعراض السريرية ، بما أن داء الكلب مرض يمكن الوقاية منه يعد التطعيم أكثر الاستراتيجيات الفعالة و الاقل تكلفة لمنع انتشاره عند الحيوان والإنسان ؛ مما يقلل من عدد الوفيات في جميع أنحاء العالم.

في الجزائر ، تعتمد الوقاية من داء الكلب على استخدام لقاح الأنسجة الغير المعطلة من نوع فنزليدا المنتج من أدمغة الفئران الحديثة الولادة ، يهدف عملنا إلى تكييف فيروس داء الكلب سلالة LPS على الخلايا BSR من خلال مقاطع متتالية بواسطة تقنية المعايرة .

أظهرت النتائج التي تم التوصل إليها إلى زيادة تدريجية في عيار الفيروس خلال ممرات التكيف، تفتح هذه الدراسة وجهات نظر لاستخدام الخلايا BSR لإنتاج لقاح داء الكلب.

الكلمات المفتاحية : فيروس LPS, داء الكلب , فنزليدا , معايرة , خلايا BSR

Synthèse bibliographique

Tableau 1. Classification des Lyssavirus.....11

Tableau 2. Prophylaxie post-exposition (PPE) recommandée par l'OMS en fonction du type de contact avec l'animal suspect.17

Matériels et méthodes

Tableau 3. La description des cellules BSR selon American Type Culture Collection.....26

Résultats et discussion générale

Tableau 4. Résultat de 2^{ème} passage.....42

Tableau 5. Résultat de 3^{ème} passage.....42

Tableau 6. Résultat de 4^{ème} passage.....43

Tableau 7. Résultat de 5^{ème} passage.....43

Tableau 8. Les résultats de titrage des suspensions virales au cours des passages d'adaptation...44

Tableau 9 : résultat de titrage par la technique d'immunofluorescence.....45

IPA : Institut Pasteur d'Algérie

LPS : Louis Pasteur Saigon

DL₅₀ : Dose létale pour 50 % des animaux

IF : Immunofluorescence

MOI : la multiplicité d'infection

OIE : Organisation Internationale des Epizooties.

OMS : Organisation Mondiale de la santé

PPE : Prophylaxie post-exposition

PPrE : Prophylaxie pré-exposition

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribo-nucléotidique messenger

ATCC : American Type Culture Collection

IC : Intracérébrale

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

IGR : Immunoglobuline antirabique

IM : Intramusculaire

MC : Matière Cérébrale

pH : potentiel hydrogène.

R.M.I : les cellules de rein de mouton immortalisées.

SC : Sous-cutanée.

TIGEF: T-Immortalized Goat Embryo Fibroblasts.

TIGMEC: T-Immortalized Goat Milk Epithelial.

VCC : Vaccin préparé sur culture cellulaire.

VCCOE : Vaccin sur culture cellulaire ou sur œufs embryonnaires

VERO : Verda Reno (Rein vert).

Introduction.....	1
Chapitre1 : Synthèse bibliographique	
I.Historique.....	3
I.1. La rage à l'époque de Pasteur et Galtier.....	3
I.2. Les progrès récents du XXe siècle	5
II. Vaccination antirabique	6
II.1. Notion de souche sauvage et souche fixe.....	6
II.2. Notion de la souche fixe de virus LPS.....	7
III. Epidémie de la rage.....	8
III.1. la rage dans le monde.....	8
III.2. La situation en Algérie.....	9
IV. Virus rabique.....	10
IV.1.Taxonomie	10
IV.2. Structure du virus rabique.....	11
IV.3. Propriétés du virus rabique.....	12
IV.3.1. Propriétés moléculaires.....	12
IV.3.2. Propriétés Physico-chimiques.....	13
IV.3.3.Pouvoir pathogène.....	13
IV.4. Cycle de réplication.....	14
IV.4.1. Fixation.....	14
IV.4.2. Pénétration.....	14
IV.4.3. Phase des synthèses virales (éclipse).....	14
IV.4.4. Assemblage.....	14
IV.4.5. Libération.....	15
V. Pathogénie de l'infection rabique.....	16
V.1.Voies de contamination.....	17
V.1.1.Voie cutanée.....	17
V.1.2.Voie interhumaine.....	17
V.1.3Voieaérienne.....	17
V.2. Parcours du virus rabique dans l'organisme.....	18
V.2.1. Pénétration et réplication locale du virus.....	18
V.2.2. Migration du virus vers le système nerveux.....	18
V.2.3. Infection du système nerveux central.....	19

VI. Clinique de l'infection antirabique.....	19
VI.1 différentes formes de la rage.....	20
VI.1.1. La rage furieuse.....	20
VI.1.2. Rage paralytique.....	20
VII. Diagnostic biologique.....	20
VII.1. Les prélèvements.....	20
VII.1.1. Les prélèvements intra-vitam.....	20
VII.1.2. Les prélèvements post mortem.....	21
VII. 2. Mise en évidence du virus rabique.....	21
VII. 2. 1. L'inoculation à la souris.....	21
VII. 2.2. L'isolement du virus rabique sur cellule en culture.....	22
VII. 2.3. L'immunofluorescence directe sur empreinte de cerveau.....	22
VII.3. la sérologie.....	23
VIII. Culture tissulaire.....	23
IX. Culture cellulaire.....	23
IX.1. Obtention des cultures cellulaires.....	24
IX.1.1. Repiquage.....	24
IX.2.Types de culture cellulaire.....	25
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....	26
I. Matériels	26
I.1. Matériels biologique	26
I.1.1. La souche vaccinale LPS.....	26
I.1.2. Les cellules BSR.....	27
I.1.3.1.description	27
I.1.3. Les souris utilisée lors de titrage	27
I.2. Matériels non biologique	28
II. Méthode.....	29
II.1. Préparation de milieu de culture	29
II.2.. Le repiquage de la lignée cellulaire BSR.....	30
II.2.1. Observation des cellules au microscope inversé.....	30
II.2.2. Lavage du tapis cellulaire.....	30
II.2.3. Trypsination d'un flasque de culture cellulaire de 75 ml de 48 h.....	30
II.2.4. Arrêt de la trypsination.....	30
II.2.5.Numération et dénombrement des cellules sur Malassez.....	31

II.2.5.1. Description.....	31
II.2.5.2. Numération.....	31
II.2.5.3. Calcul de la concentration cellulaire	32
II.2.6. Mise en culture dans de nouvelles flasques.....	32
II.2.7. Entretien.....	33
II.3. Décongélation.....	33
II.4. Infection <i>In-vitro</i> de la culture cellulaire par le virus LPS.....	33
II.5. Récolte.....	35
II.6. Le titrage sur souris	35
II.6.1. Préparation de l'inoculum.....	35
II.6.2. Mode opératoire.....	35
II.6.3. Exemple de calcul d'un titre virale de 5eme passage.....	37
II.7. Titrage d'immunofluorescence directe	38
II.7.1. Mode opératoire.....	38
II.8.Exemple de calcul du titre viral final par la méthode de Karber	39
Chapitre 3 : Résultats et discussion	41
I. Résultats.....	41
I.1. Repiquage de la lignée cellulaire BSR (BHK-21).....	41
I.2. Adaptation de virus LPS sur les cellules BSR	41
I.2.1. Infection cellulaire.....	41
I.2.2. La récolte.....	41
I.3. Résultat après l'entretien des cellules	41
I.3.1. Variations du Ph.....	41
I.3.2. Observations sous microscope photonique inversé.....	41
I.4. Résultats d'inoculation des souris par le virus LPS de 2eme passage au 5eme passage.....	42
I.5. Résultat de l'exemple de calcul d'un titre virale de 5 ^{eme} passage	44
I.6. Calcul du titre viral par la technique d'immunofluorescence IF.....	45
I.7. Résultat du calcul le titre viral final par la méthode de Karber	45
II. Discussion générale.....	46
Conclusion	49

Synthèse bibliographique

Figure 1. Louis Pasteur.....05

Figure 2. Pierre Victor Galtier.....05

Figure 3. Emile Roux.....05

Figure 4. Joseph Meister05

Figure 5. Vaccin contre la rage, le jour historique où Pasteur a vaincu la maladie1885.....06

Figure 6. La rage et les zones de risques.....08

Figure 7. (A) le virus rabique sous microscope électronique (B) illustration en 3d10

Figure 8. Structure de virus rabique12

Figure 9. Structure de gene de virus rabique12

Figure 10. Neurone infecté par le virus rabique, corps Negri.....15

Figure11. Bourgeonnement du virus de la rage.....15

Figure 12. Morsure par un chien enragé.....16

Figure 13. Mode de translocation de virus par voie aérienne.....18

Figure14. Etapes de la pathogénie de virus rabique19

Matériels et méthodes

Figure 15. Cellules BSR cultivées en flacon de culture cellulaire (A avant la l’incubation et B après l’incubation).....27

Figure 16. Souris utilisées lors de titrage.....28

Figure 17. Les cellules BSR sous microscope inversé gros×20.....33

Figure 18. Schéma explicatif de la dilution de virus rabique LPS.....35

Figure 19. Schéma explicatif des dilutions de la suspension virale.....36

Figure 20. Inoculation de la suspension virale par voie intracérébrale.....36

Figure 21. Cages contenant les souris inoculées par les différentes dilutions de suspension virale.....37

Figure 22. Les dilutions de suspension virales.....39

Figure 23. Plaque a récipients (puits) pour culture cellulaire.....39

Résultats et discussion générale

Figure 24. Variation de pH dans le milieu de culture41

Figure 25. Cinétique de titre virale au cours des passages d'adaptation.....44

Figure 26. Détection du virus rabique dans des cellules BSR. (A) Fluorescence observée dans un cytoplasme de cellules vivantes infectées par le virus.....45

La rage est une maladie infectieuse d'origine virale qui est presque toujours mortelle une fois que les symptômes cliniques sont apparus.

Elle est présente sur tous les continents sauf l'Antarctique mais plus de 95% des cas humains mortels surviennent en Asie et en Afrique, Elle fait partie des maladies tropicales négligées touchant surtout les populations pauvres et vulnérables vivant en milieu rural isolé. Bien qu'il existe des vaccins et des immunoglobulines efficaces pour l'homme, ces produits ne sont pas facilement disponibles ou accessibles pour ceux qui en ont besoin (Anonyme, 2018).

Vu que la rage est une maladie à prévention vaccinale. La vaccination est la stratégie la plus efficace et la plus rentable pour éviter la rage chez l'animal et l'homme; ce qui permet de réduire le nombre des décès imputables à la rage dans le monde.

A l'origine, le tissu cérébral infecté d'animaux adultes constituait la seule source de virus rabique pour la production de vaccin et il est encore largement utilisé, mais selon les recommandations de l'Organisation mondiale de la Santé, cette production a été récemment limitée ou abandonnée complètement car ces vaccins produits à base de tissu cérébral sont encéphalotogènes ainsi qu'elle nécessite la production de matière cérébrale des souris qui demande la présence et le travail d'au moins 10 personnes. C'est une tâche ardue, de par leur fragilité et leur sensibilité dues aux conditions de l'environnement, elle exige beaucoup de main d'œuvre, et l'élevage des souris pose un problème qui porte atteinte au rendement de cette production.

Outre le risque de virus reprenant leur virulence, des accidents tenaient aussi au fait que la myéline présente dans le vaccin pouvait causer des encéphalites allergiques, se manifestant comme des paralysies survenant entre le 13^{ème} et le 15^{ème} jour du traitement (Anonyme, 2012).

À cause de tous ces problèmes, instamment il est recommandé de produire et d'utiliser des vaccins antirabiques inactivés produits en culture cellulaire.

La mise au point de ce nouveau type de vaccin obtenu en culture cellulaire a pour le but d'obtenir un produit fortement immunogène et bien toléré, qui puisse par conséquent être utilisé à faible dose pour la vaccination de l'Homme, et qui réduirait donc les coûts globaux. Bien que les effets secondaires suivant l'inoculation des vaccins produits en culture cellulaire soient extrêmement rares (Anonyme, 1984).

Ce travail a pour but d'adapter la souche vaccinale LPS sur un nouveau support cellulaire la lignée BSR, tout en effectuant des infections successives avec la souche virale sur cette lignée. Des récoltes et des titrages des suspensions virales sont nécessaires dans chaque passage pour

établir la cinétique de titre viral au cours des passages successifs afin d'arriver à un titre viral efficace pour une première production de vaccin antirabique cellulaire à usage humain.

Cette étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de production et de développement des vaccins viraux humains de l'institut Pasteur annexe Kouba Alger.

I. Historique

Le virus de la rage est connu depuis 2300 av. J-C, persiste dans presque tous les coins du monde.

I.1. La rage à l'époque de Pasteur et Galtier

En 1880, Louis Pasteur commence à s'intéresser à la rage, comme l'atteste une de ses communications. Il prend connaissance des travaux de Galtier, qu'il considère avec un certain dédain, pensant que ces expériences « ne permettent pas de rapprocher, encore moins d'identifier la maladie avec la rage ».

Cette attitude de Louis Pasteur est fréquente : il dénigre ses précurseurs pour reprendre à son compte leurs travaux et puis s'en attribuer le mérite.

Le 1er août 1881, Galtier envoie une note à l'Académie des sciences. Il y consigne ses expériences d'inoculation intraveineuse du virus rabique dans le torrent circulatoire.

Il écrit que : « Les conclusions qui se dégagent de ces faits sont suivantes :

1. Les injections de virus rabique dans les veines du mouton ne font pas apparaître la rage et semblent conférer une immunité.
2. La rage peut être transmise par l'injection de la matière rabique » Il a donc trouvé un moyen de conférer une immunité contre la rage sur le mouton.

Il publie également dans le bulletin de l'Académie de médecine et écrit entre autres que : «J'ai injecté sept fois la salive rabique dans la jugulaire du mouton sans jamais observé la rage, un de mes sujets d'expérience a été successivement inoculé avec la bave d'un chien enragé, après quatre mois que cette inoculation a été faite, l'animal se porte toujours bien; il semble avoir acquis l'immunité. Je l'ai inoculé encore quinze jours en lui mettant huit centimètres cubes de salive rabique dans le péritoine; il va toujours très bien; prochaine je lui ferais une autre inoculation. »

Pour l'historien des sciences Jean Théodoridès, c'est la première fois dans l'histoire de la médecine que l'on émet l'idée d'immunisation contre la rage avec des résultats expérimentaux probants à la clé.

En 1883, Emile Roux publie sa thèse de doctorat en médecine sur "Des nouvelles acquisitions sur la rage". D'après Jean Théodoridès, ce qui frappe de prime abord dans ce mémoire rédigé

par Roux avec minutie et méthode est la fréquente mention des travaux de Galtier cités d'un bout à l'autre. Alors que Louis Pasteur n'évoque que tout à fait incidemment Galtier.

En 1886, Galtier publie un important livre sur la rage, "La rage envisagée chez les animaux et chez l'homme au point de vue de ses caractères et de sa prophylaxie". Le livre traite également des mesures de police sanitaire et de médecine légale, des mesures de contrôle des chiens (port du collier, de la muselière, de la laisse).

Le 30 janvier 1888, Pierre Galtier publie un article dans les Comptes rendus de l'Académie des Sciences. Il insiste sur le fait que « le virus rabique conserve son activité dans les cadavres enfouis, de sorte que, quand des doutes surgissent après coup sur la nature de la maladie qui a déterminé la mort, l'exhumation et l'inoculation du bulbe sont tout naturellement indiquées ».

En 1879, Galtier utilise pour la première fois le lapin pour étudier la rage (peu coûteux, peu exigeant, inoffensif et dont l'incubation de la maladie est inférieure à celle du chien).

Janvier 1881, Galtier découvre la vaccination préventive antirabique sur des moutons.

Mai 1881, Pasteur montre que le cerveau contient du virus rabique. Août 1881, Galtier montre l'efficacité de la vaccination avant et après exposition chez les ruminants.

Décembre 1882, Pasteur montre que l'inoculation intraveineuse ne provoque pas d'immunité chez le chien.

En 1884 et 1885, Pasteur expose sa méthode de vaccination antirabique du chien.

Octobre 1885, Pasteur expose son premier cas de vaccination humaine, Joseph Meister, âgé de neuf ans qui avait été mordu le 4 juillet, et qui a échappé, non seulement à la rage que ses morsures auraient pu développer, mais à celle que Pasteur lui a inoculé pour développer son immunité.

14 novembre 1888, inauguration de l'institut Pasteur., afin de permettre à Pasteur d'étendre la vaccination contre la rage, de développer l'étude des maladies infectieuses et de diffuser les connaissances (Rotival, 2002).



Figure 1 : Louis Pasteur



figure 2 : Pierre Victor Galtier



Figure 3 : Emile Roux



Figure 4 : Joseph Meister

I.2. Les progrès récents du XXe siècle :

1936 : tailles du virus déterminé par ultrafiltration

1958 : réaction d'immunofluorescence pour le diagnostic de la rage est mise au point par Goldwasser et Kisling.

1963 : la morphologie du virus est découverte grâce à la microscopie électronique par Atanasiu.

1964 : descriptions de la production de vaccin en lignée de cellules diploïdes humaines.

1971 : démonstrations par Baer que l'administration orale d'un virus vivant pour lutter contre la rage est possible.

1978 : productions d'anticorps monoclonaux du virus rabique par Wiktor et Koprowski.

1981 : séquençages du gène codant la glycoprotéine rabique est réalisés par Anilionis, Wunner et Curtis.

1984 : Wiktor et Kieny mettent au point un vaccin recombinant le virus de la vaccine et celui de la rage, efficace par voie orale.

1988 : mise au point du vaccin rabique à usage humain inactivé, purifié, préparé sur cellules Vero, encore utilisé actuellement (Rotival, 2002).

II. La vaccination antirabique

Le premier vaccin antirabique vivant atténué injectable, développé par Louis Pasteur et Emile Roux, a été testé pour la première fois sur une personne mordue Joseph Mestre en 1885. Il utilisait des homogénats inactivés de tissu nerveux de lapin infecté par le virus de la rage. Depuis 1984, l'OMS recommande fortement l'arrêt de la production et de l'utilisation des vaccins à base de tissus nerveux et leur remplacement par des vaccins antirabiques préparés sur cultures cellulaires modernes, concentrés et purifiés, ou préparés sur œufs embryonnés (anonyme, 2018).



Figure 5 : Vaccin contre la rage, le jour historique où Pasteur a vaincu la maladie 1885.

II.1. Notion de souche sauvage et souche fixe

Il existe de très nombreux isolats du virus obtenus à partir d'animaux ou d'hommes morts de rage. Ces souches dites sauvages ; sont antigéniquement très proches. De nouvelles souches, dites apparentées à la rage, ont été récemment isolées en Afrique à partir de chauves-souris de musaraignes, de divers animaux sauvages ou domestiques et de cas de rage humaine. Ce sont les virus Lagos Bat, Mokola et Duvenhague.

Dans les tests immunologiques, ils montrent une faible réaction croisée avec le virus rabique et forment avec lui le sous-groupe des *Lyssavirus*.

Les souches utilisées en laboratoire, appelées souches fixes, dérivent essentiellement de trois isolats de virus rabique, celui de Pasteur obtenu à partir d'un chien en 1882 (souches PI\1, PV et CVS), un autre réalisé aux Etats-Unis en 1953 également à partir d'un chien (souches SAD et ERA), et le dernier provenant d'une jeune fille décédée en 1939 aux Etats-Unis (Flury LEP et HEP). Dans chaque cas, le virus a été passé plusieurs milliers de fois sur des lapins, des souris ou des œufs embryon nés. Il est commun de dire que les souches fixes sont moins dangereuses que les souches sauvages. Cependant, en dehors de la souche Flury HEP qui a effectivement perdu toute virulence pour les animaux adultes, les autres souches sont toujours capables de tuer le lapin, la souris, le chien, le renard ... Il convient donc d'être prudent en les manipulant (Flamand, 1986).

II.2. Notion de la souche fixe de virus LPS

Le virus de la rage est capable d'infecter tous les animaux à sang chaud. Néanmoins, il provoque une pathologie très différente lorsqu'il infecte des espèces qui ne constituent pas ses cibles directes dans la nature. Ainsi, de nombreuses souches de virus rabiques isolées sur le terrain (virus des rues, virus sauvage) ont été adaptées aux rongeurs, et en particulier à la souris, pour permettre leur étude en laboratoire. Les souches adaptées se différencient ainsi des souches sauvages par le nombre de passage nécessaire à leur adaptation sur leur nouvel hôte essentiellement sur lignée cellulaire ou sur cerveau de souris. La pathologie induite par ces souches sauvages est très variable lorsqu'elles sont inoculées à la souris. En revanche, l'établissement de souches adaptées par de plus nombreux passages a permis d'obtenir des modèles hôte-pathogène précis. Pour disposer d'une souche de référence, Pasteur a essayé de fixer la virulence d'une souche isolée le 19 novembre 1882 d'un bovin en l'inoculant en série au lapin, par voie intracérébrale. Après plusieurs dizaines de passages, cette souche s'est adaptée au lapin et a perdu une partie de son pouvoir pathogène pour les autres espèces, lors d'inoculation parentérale. Une telle souche a vu certains de ses caractères se stabiliser, se fixer, d'où le terme de souche fixe, par opposition aux souches sauvages de virus des rues.

Les caractères de la souche fixe Louis Pasteur sont :

1. La constance de la période d'incubation raccourcie à 6 jours pour le lapin la recevant par voie intracérébrale contrairement à une période d'incubation de 16 à 30 js pour le virus des rues.

2. La constance du titre viral.
3. La constance du caractère paralytique des symptômes.

Les temps d'incubation et de mortalité de la maladie sont alors des paramètres constants ils sont dits fixés. La plupart des souches fixes sont dérivées de la souche pasteur, comme dans le cas de la souche CVS (challenge standard virus) du virus de la rage, adaptée par une trentaine de passages sur cerveaux de souris (Hilary *et al.*, 1974).

III. Epidémie de la rage

Le contrôle de la rage reste encore une des priorités de l'OMS. En effet, il ne faut pas sous-estimer la gravité de cette infection dans certaines parties du monde (Knobel *et al.*, 2005).

III.1. la rage dans le monde

Une maladie négligée malgré un impact humain majeur, notamment en Afrique et en Asie. Plus de 60000 personnes dans le monde meurent de la rage chaque année. La vaste majorité des cas 99% est due à des morsures de chiens et 40% des personnes mordues par un animal suspect de rage ont moins de 15 ans. L'impact pour la santé publique pèse en grande partie sur l'Asie 31000 décès estimés, mais l'estimation pour l'Afrique 24000 est probablement sous-estimée mais déjà beaucoup plus élevée qu'on ne le pensait. En effet, selon (l'OMS, 2014) tous les pays africains sont à haut risque rabique.

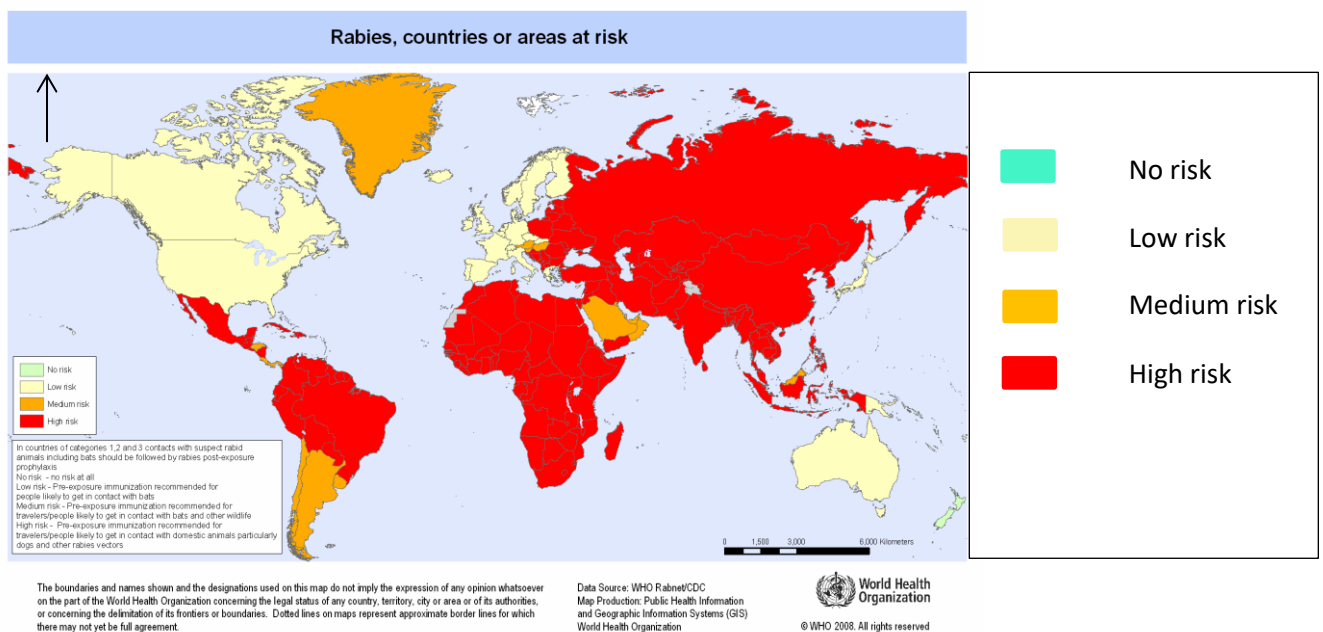


Figure 6: la rage et les zones de risques. (Anonyme, 2008)

III.2. La situation en Algérie

Deux sources de données sont disponibles pour déterminer la répartition géographique de la rage en Algérie : le nombre de cas diagnostiqués dans chaque Wilaya et celui des cas déclarés à la Direction des services vétérinaires (Benelmouffok, 2004). La répartition géographique de l'infection rabique chez les animaux était presque identique depuis plus de 45ans. L'Institut Pasteur d'Alger a essayé d'analyser cette tendance à partir de cartographies élucidant la répartition géographique de la rage en Algérie entre 2003 et 2008 (Annexe 2) (Metallaoui, 2009). 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 (Benhabyles, 2008) (Annexe 2). 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 (Dominguez, 2009).

IV. Virus rabique

Selon Evans (2012), le virus de la rage est un virus neurotrope appartenant au genre *Lyssavirus* au sein de la famille des *Rhabdoviridae* (Fig.7).

Le virus rabique est un virus à capsid tubulaire de forme allongée de longueur variable (130 à 300 nm), en balle de revolver ou d'obus, à l'image de sa méchanceté. Son péplos, dérivé de la membrane cytoplasmique, porte des spicules d'hémagglutinine constituées d'une glycoprotéine. Le virus rabique est extrêmement fragile, ne survit pas dans le milieu extérieur et c'est son mode de transmission transcutané par morsure qui lui permet de remédier à cette fragilité.

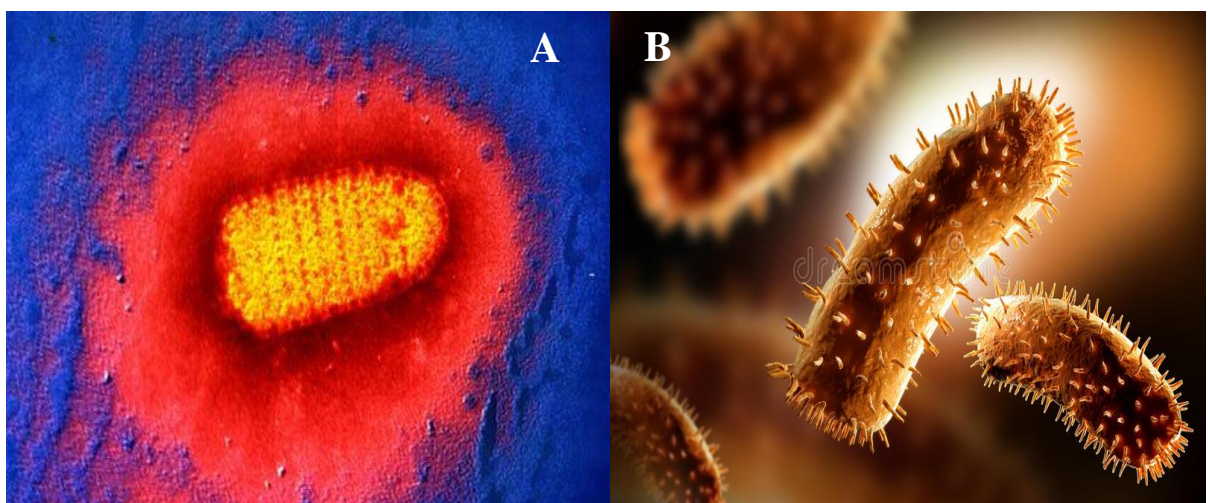


Figure 7 : (A) le virus rabique sous microscope électronique (B) illustration en 3d (anonyme, 2016)

IV.1.Taxonomie

L'ICTV « International Committee on Taxonomy of Viruses » reconnaît 14 espèces de *Lyssavirus* dont 6 « RABV, EBL1, EBL2, DUVV, MOKV, ABLV » ont été à l'origine de cas de rage humaine (Evans, 2012).

Tous les mammifères sont sensibles à la rage et les vecteurs des *Lyssavirus* sont exclusivement des carnivores ou des chiroptères avec une adaptation spécifique du virus à son vecteur signant probablement une longue coévolution.

Tableau 1 : Classification des Lyssavirus (Laurent, 2011).

Dénomination	Espèce	Distribution géographique
Virus rabique	RABV	Monde entier, à l'exception de l'Antarctique.
European bat <i>Lyssavirus</i> type 1	EBL1	Europe
European bat <i>Lyssavirus</i> type 2	EBL2	Europe
Duvenhage virus	DUVV	Afrique
<i>Mokola</i> virus	MOKV	Afrique
Australien bat <i>Lyssavirus</i>	ABLV	Australie

L'espèce prototype RABV pour (Rabies Virus) est la plus fréquemment identifiée dans les cas de rage humaine et les souches vaccinales sont issues de la même espèce. Toutefois, plusieurs travaux ont montré qu'il était possible d'accroître le spectre des vaccins antirabiques pour en faire des vaccins *anti-Lyssavirus* (Kuzmin, 2012).

IV.2. Structure du virus rabique

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

L'enveloppe composée d'un double feuillet phospholipidique entoure tout le virion. Elle comporte deux protéines d'origine virale, la glycoprotéine G et la protéine de matrice M.

La G, en position transmembranaire, s'associe sous forme de trimères pour constituer des spicules. En microscopie électronique, les spicules distants d'environ 5 nm apparaissent disposés régulièrement autour du virion et donnent au virus son aspect hérissé. La M, forme un manchon

entre l'enveloppe et la nucléocapside virale (Delmas, 2008).

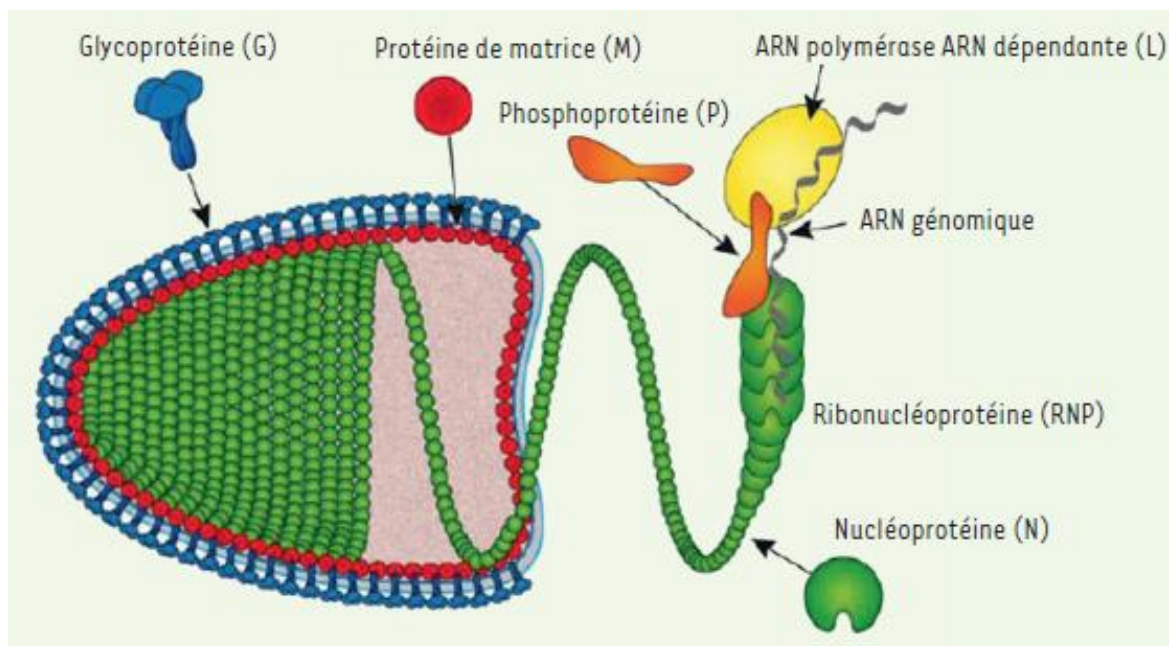


Figure 8 : Structure de virus rabique (Florence, 2013)

IV.3. Propriétés du virus rabique

IV.3.1. Propriétés moléculaires

La nucléocapside est constituée de l'ARN génomique, environ 12 000 nucléotides associés à 3 protéines virales « la nucléoprotéine N, ARN polymérase dépendante L et la phosphoprotéine P ».

L'ARN génomique est linéaire, monocaténaire, non segmenté, non polyadénylés et de polarité négative. La transcription de 3' en 5' aboutit à la production séquentielle de 5 ARN messagers en quantité décroissante, monocistroniques coiffés et polyadénylés, codant pour les protéines N, M, P, G et L. La protéine N est étroitement liée à l'ARN sur la totalité de sa longueur. Les protéines P et L ont un rôle fonctionnel important dans les phénomènes de transcription et de réplication du génome viral (Delmas, 2008)

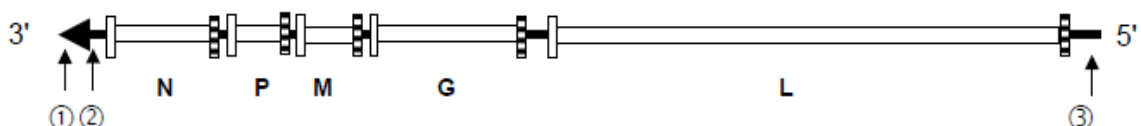


Figure 9: structure de gene de virus rabique

1. Un site promoteur sur lequel la transcriptase se fixe
2. Une séquence transcrite en un ARN leader et servant de signal d'encapsidation il fixe la protéine N.
3. Est une séquence non codante

IV.3.2. Propriétés Physico-chimiques

La composition chimique du virion, étudié sur une souche, montre 74 % de protéines, 22 % de lipides, 3 % de glucides et 1 % d'acide ribonucléique. Ce virus, assez fragile, ne persiste pas dans l'environnement. Il est sensible à de nombreux agents physiques tels que la lumière et les ultraviolets, la dessiccation lente la chaleur. L'inactivation par chauffage est obtenue en 35 secondes à 60°C, en 15 mnts à 50°C. Il se conserve plusieurs jours à 4°C, et plusieurs années à -70°C ou lyophilisé et gardé à 4°C.

Il est très sensible aux agents chimiques, en particuliers aux solvants organiques en raison de la nature lipidique de son enveloppe. Les solutions savonneuses, la plupart des antiseptiques et des désinfectants (hypochlorites de sodium) exerce une action virucide rapide dans les conditions normales d'utilisation, d'où l'intérêt du lavage et de la désinfection des plaies. Il supporte mâles pH extrêmes 5 à 10. Par contre, il résiste dans une solution glycinée à 50 % (Chantal, 1985).

IV.3.3. Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène du virus rabique se révèle et s'étudie au laboratoire par inoculation aux animaux à sang chaud qui sont sensibles tel que :

La souris, le Cobaye, le hamster, le lapin, notamment chez les sujets jeunes par le matériel virulent (substance nerveuse, glandes salivaires, cultures, soit par voie intracérébrale, soit par voie intramusculaire, inguinale ou oculaire. Par contre les animaux à sang froid sont réfractaires. Ce virus possède un tropisme très marqué pour le système nerveux central, surtout dans les cornes d'Ammon. La virulence d'une souche dans les conditions naturelles est liée au nombre de virions inoculés, et quel que soit la Première partie Synthèse bibliographique 14 souche (hypo ou hyper virulente). Elle dépend aussi selon la réceptivité : la chauve-souris après inoculation est guérie, mais chez l'homme toujours mortel, par contre dans les conditions expérimentales la virulence peut diminuer lors de passage successifs aux animaux, elle est appelée une souche sauvage ou modifiée qui présente par un « virus de rue » caractérisée aussi par une durée d'incubation variable, elle est pathogène chez le lapin au niveau du tissu conjonctif nerveux et non pathogène chez l'homme utilisé comme vaccin atténué (kabouia, 2007)

IV.4. Cycle de réplication

IV.4.1. Fixation

Les spicules ou les trimères de G, se fixent aux récepteurs cellulaires. Les récepteurs doivent être présents sur les nombreux types cellulaires sensibles à l'infection de tissus musculaire, nerveux, cutané, glandulaire (glandes salivaires, foie, reins). Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine serait important pour l'infection des cellules musculaires et des neurones par le virus rabique (Mammette, 2002).

IV.4.2. Pénétration

Le virion est endocyté par la cellule, l'acidification de l'endosome modifie la conformation de la glycoprotéine G qui acquiert des propriétés fusogéniques, l'enveloppe fusionne avec la membrane de l'endosome et la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme (Mammette, 2002)..

IV.4.3. Phase des synthèses virales (éclipse)

C'est l'expression du génome, l'ARN viral est transcrit en ARN messagers qui sont traduits en protéines. La libération de la nucléocapside dans le cytoplasme active les complexes de transcription [P + L], dont le P, en reconnaissant le promoteur unique situé au début du génome, favorise le positionnement de L. la protéine L exerce 3 activités enzymatiques :

1. ARN polymérase ARN dépendante exerçant les deux activités transcriptase et réplacase.
2. la méthylase pour la coiffe des ARN-messagers.
3. Poly A polymérase pour la queue des ARN-messagers.

Puis synthèse de nouveaux génomes (v-ARN) à partir de ces matrices. Les nouveaux génomes sont transcrits en ARN messagers qui sont traduits en protéines de structure (Mammette, 2002).

IV.4.4. Assemblage

Assemblage des vésicules ont transporté les spicules vers la région baso-latérale de la membrane cytoplasmique avec laquelle elles fusionnent. La protéine M se dépose sur la face interne de la membrane cytoplasmique. Elle interagit avec l'extrémité des spicules qu'elle rassemble, avec les nucléocapsides dont elle assure la condensation sous la forme hélicoïdale caractéristique. Bien que les brins d'ARN soient recouverts par la protéine N, seules les nucléocapsides virales se fixent à la protéine M.

Le mécanisme assurant cette sélection n'est pas connu. Nucléocapsides et virions s'amassent dans une matrice fibreuse et forment des inclusions pathognomoniques et caractéristiques observables au microscope optique, les corps de Negri, du nom du médecin italien, Adelchi Negri, qui a décrit cette lésion en 1903 (Mammette, 2002).

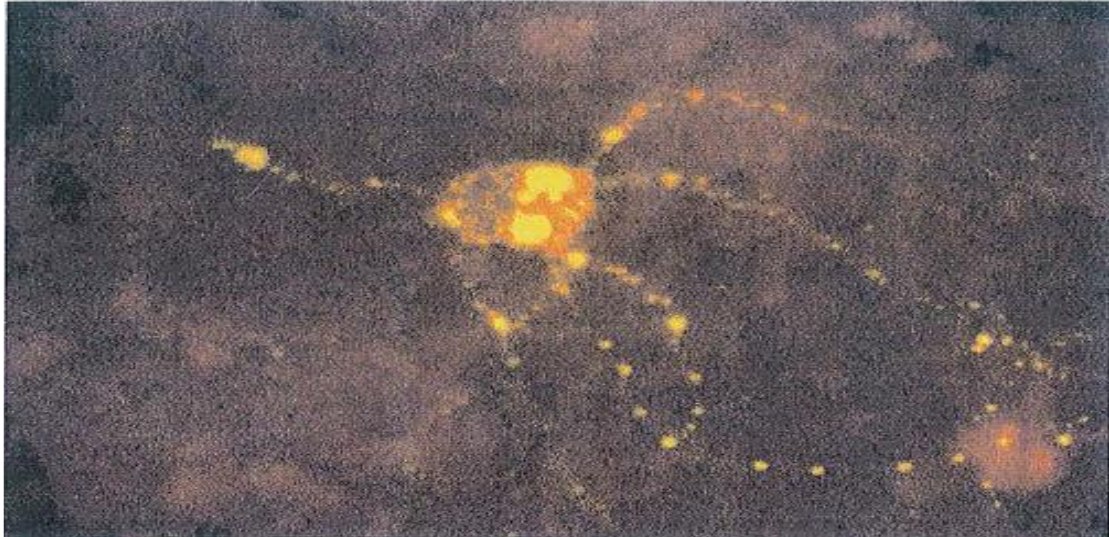


Figure 10 : Neurone infecté par le virus rabique, corps Negri (Anonyme, 2014).

IV.4.5. Libération

Un bourgeonnement externe des particules virales, à partir de la membrane cytoplasmique, .soit un bourgeonnement interne à partir des membranes du réticulum et de l'appareil de Golgi (où a eu lieu la synthèse et la glycosylation de la protéine d'enveloppe G). Dans ce cas, les virions sont transportés dans des vésicules qui fusionnent avec la membrane (Mammette, 2002).

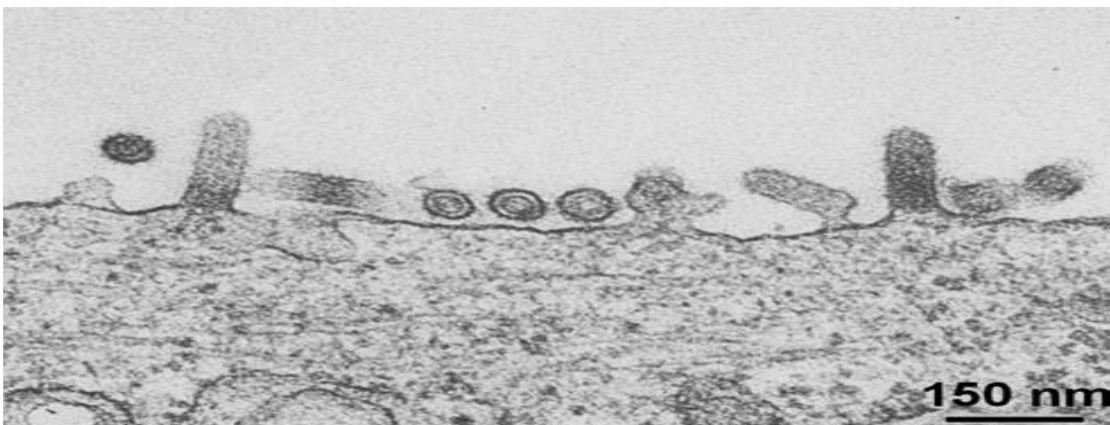


Figure11 : bourgeonnement du virus de la rage (Lemahieu et Decoster,2002).

V. Pathogénie de l'infection rabique

V.1. Voies de contamination

V.1.1. Voie cutanée

La plupart des cas de rage résultent de la morsure d'un chien infecté. Les conséquences d'une exposition au virus rabique dépendent de plusieurs facteurs, notamment la gravité de la plaie, l'emplacement de la morsure sur le corps, la quantité et la variante (génotype) du virus transmis dans la plaie et l'administration en temps utile de la prophylaxie post-exposition (PPE). A défaut de PPE, la probabilité moyenne de développer la rage à la suite d'une morsure par un animal enragé est de 55 % pour une morsure à la tête, 22 % pour une plaie au niveau d'un membre supérieur, 9 % au niveau du tronc et 12 % au niveau d'un membre inférieur (Shim *et al.*, 2009).

La charge virale dans la salive des chiens infectés par le virus rabique varie au cours de la maladie et influe sur le risque d'infection des personnes victimes de morsures (Hemachudha *et al.*, 2013).

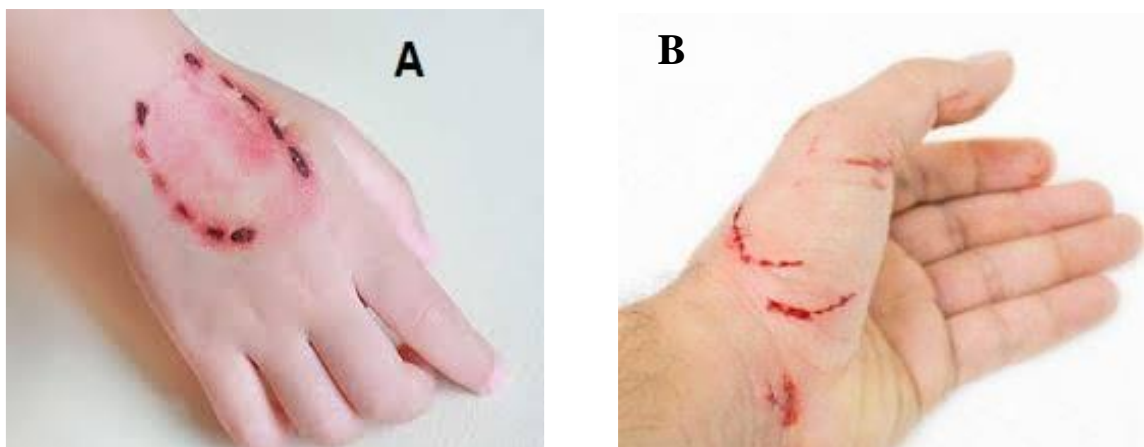


Figure 11 : Morsure par un chien enragé (Gloaguen, 2017)

Les catégories suivantes décrivent le risque d'exposition au virus de la rage selon le type de contact avec l'animal suspecté enragé. La catégorie d'exposition détermine la procédure de PPE indiquée. L'infection par le virus rabique chez les rongeurs est très rare. Aucun cas de rage humaine due à des morsures de rongeurs n'a été rapportée (Anonyme, 2018).

Tableau 2 : Prophylaxie post-exposition (PPE) recommandée par l'OMS en fonction du type de contact avec l'animal suspect. (Anonyme, 2014)

Type de contact avec un animal suspect	Mesures de prophylaxie post-exposition
Catégorie I : contact avec l'animal (la personne l'a touché ou nourri) ou	Aucune
Catégorie II : mordillement de la peau nue, griffures ou égratignures	Lavage extensif de la plaie, vaccination immédiate
Catégorie III : morsures ou griffures uniques ou multiples ayant traversé le derme, léchage de la peau lésée contamination des muqueuses par la salive après léchage, exposition à des chauves-souris.	Vaccination immédiate d'immunoglobulines antirabiques par instillation dans et autour de la plaie.

V.1.2. Voie interhumaine

Le virus de la rage est présent dans la salive, les larmes, l'urine et les tissus nerveux des cas de rage humaine et l'exposition à ces liquides et tissus corporels comporte un risque théorique de transmission. Le virus n'est pas présent dans le sang. La transmission interhumaine du virus rabique est extrêmement rare et ce risque très faible ne doit pas compromettre les soins aux patients. Les seuls cas documentés de transmission interhumaine se sont produits lors de greffes de tissus et d'organes de personnes infectées par le virus rabique, et un seul cas de transmission périnatale probable du virus a été rapporté (Rupprecht et *al.*, 2016).

D'après la bio-pathologie et l'épidémiologie, la transmission par l'allaitement maternel est peu probable, bien que les données scientifiques soient très limitées (Aguèmon et *al.*, 2016).

V.1.3. Voie aérienne

il s'agit d'une modalité exceptionnelle :

Cas d'une inhalation d'un aérosol de particules virales (qui sont ensuite véhiculées par le nerf olfactif).

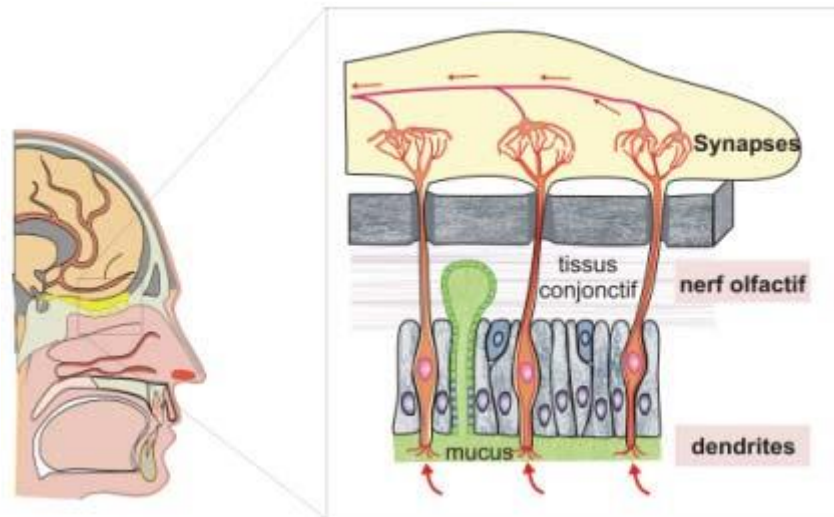


Figure 13 : mode de translocation du virus par voie aérienne (Mammette, 2002)

Cas d'une visite d'une grotte habitée par des colonies importantes de chauves-souris. Dans cette situation, les chauves-souris volant dans tous les sens, des contacts percutanés ne sont cependant pas exclus (Mammette, 2002).

V.2. Parcours du virus rabique dans l'organisme

Dans l'organisme, l'infection va gagner le cerveau en cheminant le long des nerfs, par voie axonale centripète : c'est la neuroprobasie. Ce trajet correspond à la période de l'incubation qui peut varier de 6 jrs à 1 an ou plus. En effet le virus de la rage est fortement attiré par les tissus nerveux, et se réplique peu dans les muscles à proximité du site d'inoculation. S'il n'a pas été inactivé par la réponse immunitaire, il progresse lentement vers le système nerveux central de cellule nerveuse en cellule nerveuse et échappe ainsi à toute reconnaissance immunitaire (Anonyme, 2003).

V.2.1. Pénétration et répllication locale du virus.

Il se réplique d'abord dans les cellules musculaires et pénètre ensuite dans les cellules nerveuses par endocytose au niveau des terminaisons nerveuses libres et les jonctions neuromusculaires (Mammette, 2002).

V.2.2. Migration du virus vers le système nerveux

La phase neurotrope de l'infection rabique commence lorsque les particules virales atteignent les terminaisons nerveuses périphériques à partir desquels le virus migre par le flux axo-plasmique rétrograde actif vers le corps du neurone (Bauer *et al.*, 2014).

Les virions sont transportés dans les axones par la dynéine vers le corps cellulaire où le virus se réplique. Les virions qui bourgeonnent du neurone infecté sont libérés dans l'espace inter synaptique et infecte le neurone post synaptique suivant. Le virus parvient au cerveau où il se réplique (Mammette, 2002).

V.2.3. Infection du système nerveux central :

Les neurones sont les cellules cibles du virus rabique et la réplication virale produit des inclusions virales cytoplasmiques visibles par coloration spécifique appelés corps de Negri (Lahaye et *al.*, 2009)

Après la réplication dans le système nerveux central (Jackson, 2013), Le virus se dissémine ensuite dans tous les tissus par voie centrifuge, infectant les glandes salivaires mais aussi l'œil, les follicules pileux, le pancréas et les reins (Mammette, 2002).

La phase d'incubation est le temps nécessaire au virus pour remonter vers le système nerveux central. Elle dure en moyenne de 3 à 12 semaines chez l'homme (Jackson, 2013).

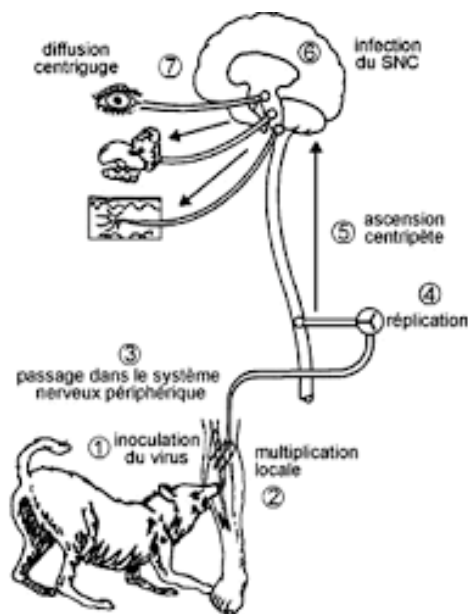


Figure14: Etapes de la pathogénie du virus rabique (Fertas, 2017).

VI. Clinique de l'infection rabique

Chez l'animal : les symptômes dépendent de l'espèce concernée. On observe une ataxie généralisée, de l'hyperesthésie, des douleurs cervicales, une hyper-salivation marquée et parfois des convulsions des muscles faciaux (Veysier, 1993).

Chez l'homme : on observe des troubles des fonctions cérébrales supérieures, anxiété, confusion, agitation avec troubles du comportement, hallucination, insomnies et éventuel.

La production de grande quantités de salive et de larmes avec difficulté de déglutition sont typiques des phases avancées (Veyssier, 1993).

VI.1. Différentes formes de la rage

VI.1.1. La rage furieuse

La plus fréquente, elle réalise un tableau d'excitation psychomotrice majeur avec hallucinations et convulsions. Une hyperesthésie cutanée sensorielle explique l'exacerbation des symptômes à la moindre excitation. La soif est vive mais des contractions paroxystiques du pharynx provoquent le spasme hydrophobique, caractéristique de la rage humaine : répulsion intense, contracture des traits, souffrance extrême, lutte avec l'entourage et cris lors des tentatives pour faire boire le malade (hydrophobie caractéristique). La salivation est exagérée. Une fièvre majeure s'associe à une atteinte neurovégétative avec irrégularité cardiorespiratoire et sueurs abondantes (Veyssier, 1993).

VI.1.2. Rage paralytique

Elle réalise un symptôme paralytique ascendant de type Landry : paralysie des membres inférieurs, puis troubles sphinctériens, enfin, atteinte bulbaire avec paralysie des nerfs crâniens et arrêt cardiorespiratoire.

La forme furieuse est plus mortelle (3-4 js) que la forme paralytique (5-6 js) (Veyssier, 1993).

VII. Diagnostic biologique :

Le diagnostic vise à détecter les composants viraux ou les anticorps produits en réponse à ces composants viraux (David et *al.*, 2002).

VII.1. Les prélèvements

Les prélèvements peuvent s'effectuer chez l'homme comme chez l'animal. Le choix des prélèvements conditionne la sensibilité du diagnostic ainsi que les techniques de diagnostic qui seront mises en œuvre (Aubry, 2005).

VII.1.1. Les prélèvements intra-vitam

Ils doivent être variés et répétés chez le patient suspect car ils sont souvent négatifs (Veyssier, 1993).

Les différents types de prélèvements à réaliser sont :

1. Sang ou sérum : titrage des anticorps.
2. Ponction Lombar : recherche d'anticorps, d'antigènes ou de virus rabiques dans le liquide céphalo-rachidien, cyto-chimie non spécifique avec glyco-rachie normale, protéino-rachie modérée à 150 mg/litre, 50 à 500 cellules par mm³ à prédominance lymphocytaire.
3. Salive: recherche de virus et d'antigènes rabiques.
4. Biopsies cutanées: au niveau des follicules pileux du menton et de la nuque pour la recherche de virus et d'antigènes rabiques (Bourhy, 1994).

VII.1.2. Les prélèvements post mortem

S'effectue à partir du cortex, de l'hippocampe et du bulbe rachidien comme chez l'animal. En revanche, le diagnostic intra vitam porte principalement sur la salive, le sérum, l'urine et des biopsies cutanées au niveau de la nuque (Guyatt *et al.*, 2003).

VII. 2. Mise en évidence du virus rabique

Les cibles du diagnostic de la rage sont le virus infectieux, la nucléocapside virale qui s'accumule dans le cytoplasme des cellules infectées, les acides nucléiques viraux composés d'acides ribonucléiques (ARN génomique, ARN anti-génomique et ARN messagers). Les techniques de laboratoire utilisées doivent permettre de donner un résultat dans un délai bref, compatible avec l'urgence du traitement antirabique, ainsi qu'avec l'application efficace des mesures de prophylaxies sanitaires et médicales chez les animaux exposés. Trois types de techniques sont employés pour le diagnostic biologique (David *et al.*, 2002).

VII. 2. 1. L'inoculation à la souris

Cinq à dix souris de 3 à 4 semaines (soit de 14 à 15 g) ou une portée de souriceaux nouveau-nés de 2 js, sont inoculés par voie intracérébrale. Il est recommandé, bien que cela ne soit pas strictement essentiel, d'utiliser des souris indemnes d'organismes pathogènes spécifiques (IOPS). L'inoculum est le surnageant clarifié d'un broyat à 20 % (poids/volume) de tissus nerveux (cortex, cornes d'Ammon, cervelet, bulbe rachidien) dans un tampon isotonique contenant des antibiotiques. Pour réduire la souffrance animale, les souris doivent être anesthésiées lors de l'inoculation. Les souris sont contrôlées tous les jours pendant 28 jrs, toute souris qui meurt pendant la période d'observation est testée par immunofluorescence (IF). Par exemple, avec un virus de renard, les mortalités commencent 9 jrs après l'inoculation. L'utilisation de souriceaux

permet d'obtenir des résultats plus rapidement, il est possible de contrôler un souriceau par IF 5, 7, 9 et 11 js après l'inoculation (Hilary *et al.*, 1974).

VII. 2.2. L'isolement du virus rabique sur cellule en culture

Des lignées cellulaires de neuroblastomes, comme la lignée CCL-131 de l'American Type Culture Collection (ATCC) 1, sont utilisées pour le diagnostic de routine de la rage. Les cellules sont cultivées dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 5 % de sérum de veau fœtal (SVF) à 36°C avec 5 % de CO₂. La sensibilité des neuroblastomes a été comparée à celle des cellules de rein de hamster nouveau-né (BHK-21). Cette lignée de neuroblastomes est sensible aux isolats sauvages sans aucun temps d'adaptation, mais elle devrait être testée vis-à-vis de variantes locales du virus rabique avant d'être utilisée. La présence du virus rabique dans les cellules est mise en évidence par IF. Le résultat est obtenue après au moins 18 h d'incubation (durée d'un cycle de réplication du virus dans les cellules), en général l'incubation est de 48 h et peut atteindre 4 jrs (Hilary *et al.*, 1974).

VII. 2.3. L'immunofluorescence directe sur empreinte de cerveau

L'épreuve la plus utilisée pour le diagnostic de rage est l'IF, elle est recommandée à la fois par l'OMS et l'OIE (organisation mondial de la santé animal). Cette épreuve peut être utilisée directement sur un étalement, elle peut aussi être utilisée pour confirmer la présence de l'antigène rabique dans des cellules ou le cerveau de souris inoculées pour diagnostic sur les prélèvements frais, l'IF donne des résultats fiables dans plus de 95 à 99 % des cas. La sensibilité de l'IF dépend de l'échantillon (de son degré d'autolyse et de la manière dont il a été prélevé), du type de Lyssavirus et de la compétence de l'équipe de diagnostic. Chez des animaux qui ont été vaccinés, la sensibilité de l'épreuve peut être inférieure à cause de la localisation de l'antigène, confiné au tronc cérébral. Pendant le diagnostic direct, les échantillons prélevés dans plusieurs zones du cerveau, y compris le tronc cérébral, sont fixés à froid dans le l'acétone de haute qualité puis colorés avec une goutte de conjugué spécifique. Le conjugué antirabique fluorescent peut être préparé au laboratoire. Les conjugués commerciaux sont soit des conjugués poly-clonaux spécifiques du virus entier ou de sa nucléocapside, soit un mélange de différents Anticorps monoclonaux. Dans l'épreuve d'IF, les agrégats spécifiques de nucléocapside sont identifiés par leur fluorescence. La spécificité et la sensibilité de ces conjugués antirabiques fluorescents vis-à-vis des variantes locaux du virus doit être contrôlée avant leur utilisation (Hilary *et al.*, 1974).

VII.3. la sérologie

Le titrage des anticorps rabiques permet d'apprécier le degré de l'immunité chez les sujets en cours de traitement antirabique ou vaccinés préventivement. Les experts de l'OMS considèrent qu'un individu vacciné doit présenter un taux d'anticorps supérieur à 0,5 unité internationale (UI)/ml (Aubry, 2005). La détection des anticorps n'a en revanche qu'un intérêt limité dans le diagnostic de la rage. En effet les anticorps n'apparaissent qu'en phase ultime de l'évolution de la maladie. Le titrage des anticorps par sero-neutralisation s'effectue sur culture cellulaire (épreuve rapide de réduction des foyers fluorescents). Un délai de 24 h est nécessaire pour l'obtention du résultat. Une technique de titrage des anticorps par ELISA, moins lourde et plus rapide, est très largement utilisée en routine. (Guyatt et *al.*, 2003).

VIII. Culture tissulaire

Selon John, (2007). La culture de tissus est le terme général englobant le prélèvement de cellules, tissus ou organes d'un animal ou d'une plante et leur placement ultérieur dans un environnement artificiel conduisant à leur croissance. Cet environnement est généralement constitué de récipients de cultures appropriés en verre ou en plastique contenant un milieu liquide ou semi-solide qui apporte les nutriments essentiels à la survie et à la croissance. La culture d'organes entiers ou de fragments d'organes intacts dans l'intention d'étudier leur fonctionnement ou leur développement prolongés est appelée Culture d'organe.

Lorsque les cellules sont retirées des fragments d'organe avant, ou pendant la culture, interrompant ainsi leurs relations normales avec les cellules voisines, on appelle cela Culture de cellules.

IX. culture cellulaire

La culture de cellules animales ait été réussie pour la première fois par Ross Harrison en 1907, il a fallu attendre la fin des années 1940 et le début des années 1950 pour voir apparaître plusieurs développements qui ont rendu la culture cellulaire largement disponible comme outil pour les scientifiques. Tout d'abord, le développement des antibiotiques a permis d'éviter plus facilement de nombreux problèmes de contamination qui empoisonnaient jusqu'alors les essais de culture. Ensuite se sont développées des techniques, telles que l'utilisation de trypsine pour retirer les cellules des récipients de culture, nécessaires pour obtenir des lignées cellulaires cultivées en continu (Jhon, 2007). Enfin, à l'aide de ces lignées cellulaires, les scientifiques ont pu développer des milieux de culture cellulaire standardisés chimiquement définis facilitant énormément la

culture de cellules. Ces trois points combinés sont permis à de nombreux autres chercheurs d'utiliser la culture de cellules, tissus et organes dans leur recherche.

Pendant les années 1960 et 1970, la commercialisation de cette technologie a eu un impact supplémentaire sur la culture cellulaire, impact qui continue de nos jours. Les entreprises, comme Corning, ont commencé à développer et vendre des produits pour la culture en verre et en plastique à usage unique, et ont amélioré les matériaux et produits de filtration, les milieux de culture tissulaire liquides et en poudre, et les hottes à flux laminaire. Le résultat de tout ceci et des autres développements technologiques continus a été une augmentation croissante du nombre de laboratoires et d'industries utilisant aujourd'hui les cultures de cellules (John, 2007).

IX.1. Obtention des cultures cellulaires

Culture primaire Lorsque les cellules sont prélevées chirurgicalement d'un organisme et placées dans un environnement de culture approprié, elles se fixent, se divisent et prolifèrent. C'est ce qu'on appelle une Culture primaire. Il existe deux méthodes de base pour faire cela. Dans la première, pour les Cultures d'explants, de petits morceaux de tissus sont fixés sur un récipient de culture en verre ou en plastique traité et baignés dans du milieu de culture. Après quelques jours, des cellules individuelles se déplacent de l'explant de tissus vers la surface du récipient de culture ou le substrat où elles commencent à se diviser et proliférer. Dans la deuxième, méthode la plus généralement utilisée, ce processus est accéléré en ajoutant des enzymes de digestion (protéolytiques), telles que la trypsine ou la collagénase, à des fragments de tissus pour dissoudre le ciment maintenant les cellules ensemble. Ceci crée une suspension de cellules individuelles qui sont placées dans des récipients de culture contenant un milieu de culture pour les laisser pousser et se diviser. Cette méthode est appelée Dissociation enzymatique (John, 2007).

IX.1.1. Repiquage

Lorsque les cellules dans le récipient de culture primaire ont poussé et couvert tous mit le substrat de culture disponible, elles doivent être repiquées pour leur donner de la place afin d'avoir une croissance continue. Cela se fait généralement en les retirant aussi délicatement que possible du substrat avec des enzymes. Ces enzymes sont similaires à celles utilisées pour obtenir la culture primaire et sont utilisées pour rompre les liaisons protéiques liant les cellules au substrat. Certaines lignées cellulaires peuvent être récoltées en grattant délicatement les cellules du fond du récipient de culture. Une fois libérées, les cellules en suspension peuvent être divisées et placées dans de nouveaux récipients de culture. Lorsqu'un surplus de cellules est disponible, il est possible de les traiter avec des agents cryoprotecteurs adaptés, comme le

diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le glycérol, de les congeler délicatement puis de les stocker à des températures cryogéniques (en dessous de -130°C) jusqu'à ce qu'on en ait besoin (John, 2007).

IX.2. Types de culture cellulaire

Les cellules cultivées sont généralement décrites d'après leur morphologie (forme et apparence) ou leurs caractéristiques fonctionnelles.

Il existe trois morphologies de base:

1. **Type épithélial:** ces cellules sont attachées à un substrat et apparaissent plates et de forme polygonale.
2. **Type lymphoblaste:** ces cellules ne se fixent pas normalement à un substrat mais restent en suspension avec une forme sphérique.
3. **Type fibroblaste:** ces cellules sont attachées à un substrat et apparaissent allongées et bipolaires.

Il faut garder à l'esprit que les conditions de culture jouent un rôle important dans la détermination de la forme et que de nombreuses cultures de cellules sont capables de présenter plusieurs morphologies (John, 2007).

I. Matériels

L'expérience de notre travail a été réalisée au niveau de laboratoire de la production de vaccin antirabique à l'institut Pasteure annexe Kouba Alger sous la supervision de chef service monsieur le Co promoteur Khadir mouloud.

I.1. Matériels biologique

I.1.1. La souche vaccinale LPS

L'OMS recommande de n'utiliser qu'une seule souche de virus rabique fixe pour la fabrication d'un vaccin. Celle utilisée à l'IPA est La souche fixe Louis Pasteur Saigon LPS du virus rabique. Cette souche virale avait été envoyée de Paris à Saigon par Calmette en 1890, et entretenue depuis sur cerveaux de lapin. Elle a été réexpédiée de Saigon à Paris, en juillet 1963, à son 3258^{ème} passage. Après 5 passages à Paris, elle est envoyée en Algérie le 4 décembre 1965, à son 3263^{ème} passage.

Actuellement en Algérie, la souche Louis Pasteur Saigon LPS est à son 20^{ème} passage, équivalent au 3278^{ème} passage depuis l'origine (Hilary et al., 1974).

I.1.3. La lignée cellulaire BSR (BHK-21)

Les fibroblastes rénaux de bébé hamster, Cellules BSR (C-13) (ATTC CCL10) (American Type Culture Collection, Rockville, Md.), sont une lignée cellulaire adhérente utilisée en biologie moléculaire. Les cellules ont été dérivées en 1961 par IA Macpherson et MGP Stoker. De nos jours, le sous-clone 13 est utilisé occasionnellement. Il a été dérivé à l'origine par isolement d'une cellule unique des reins de cinq hamsters âgés d'un jour et non sexés (Hilary et al., 1974).

I.1.3.1. description

Tableau 3 : la description des cellules BSR selon American Type Culture Collection (anonyme, 2018)

Organisme	Mesocricetus auratus, hamster, doré de Syrie
Tissu	Rein
Type de cellule	Fibroblaste

Age	1 j nouveau-né
Morphologie	Fibroblaste
Propriétés de croissance	Adhérent
Analyse cytogénétique	pseudo-diploïde

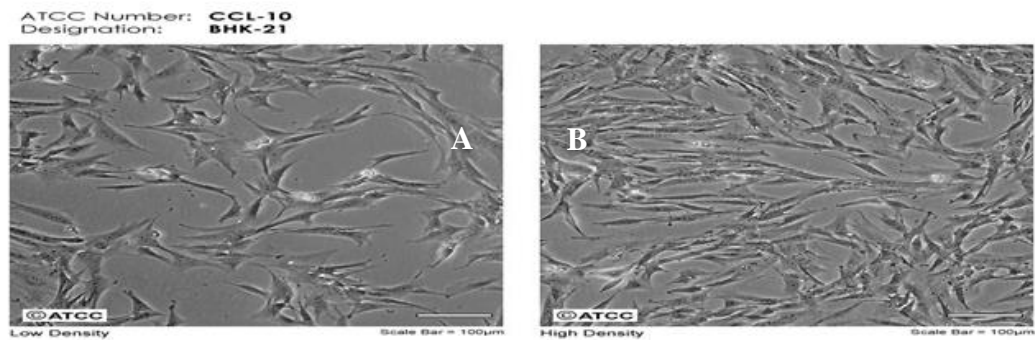


Figure 15 : Cellules BSR cultivées en flacon de culture cellulaire (A avant la l'incubation et B après l'incubation) (Anonyme, 2018)

I.1.4. Les souris utilisées lors de titrage

Sont des souris blanches, la souche N'MRI albinos de la Suisse, à bonne croissance, âgées de 6 semaines, pesant chacune ($15g \pm 1g$), élevées à l'institut Pasteur d'Algérie service de production.

Elles sont très sensibles au virus rabique et facile à élever en laboratoire, on utilise les deux sexes de souris, mais il est recommandé de ne pas les garder dans les mêmes cages après l'inoculation par le virus de la rage (Hilary et *al.*, 1974).



Figure 16 : Souris utilisées lors de titrage (original, 2019)

I.2.1. Matériels et équipements

La culture cellulaire nécessite des conditions de stérilité absolues, toute contamination microbienne entraîne la lyse des cellules.

C'est pourquoi on manipule dans des salles réservées à cet effet, et qui permet d'obtenir des résultats fiables. Les équipements et le matériel utilisés pour notre travail figurent sur (l'annexe 1).

II. Méthodes

A partir d'une suspension virale qui titre 2,33 récolté après un premier passage sur support cellulaire BSR on a commencé le 2^{ème} passage.

II.1. Préparation de milieu de culture

La préparation des milieux de culture DMEM.

Le milieu de culture cellulaire est préparé à partir d'un milieu en poudre, fourni par le Fabricant sous forme de flacons.

Présentation.

Pour DMEM ont a :

Les flacons de milieu en poudre pour reconstitution de 5 litres de milieu.

Le milieu en poudre doit être :

- Reconstitué dans l'eau permutée ou purifiée.
- Adjonction de bicarbonate de sodium et solution d'antibiotique-antimycotique
- Ajusté à pH 7.4
- Stérilisé par filtration sur membrane de 0.45 puis 0.22 μm .

Mode opératoire.

Mesurer 90 % de volume final d'eau permutée dans un flacon contenant un barreau aimanté et Placer le flacon sur agitateur magnétique

Verser le contenu du flacon de milieu en poudre et ajouter du bicarbonate de sodium (NaHCO_3) à raison de 1.2 g/litre

Ajouter la solution antibiotiques-antimycotique à raison de 2 ml/litre et laisser tourner sur agitation magnétique jusque à dissolution complète

Ajouter le restant d'eau permutée et mesurer le pH sur une petite quantité de milieu prélevée dans un flacon par la suite ajuster le pH si nécessaire à 7.4 par adjonction de gouttes d'acides chlorhydrique, et puis filtre (sous hotte) sur membrane filtrante de 0.45 μm et sur membrane filtrante de 0.22 μm .

Répartir le milieu, selon convenance, en flacon de 100, 250, 500 ml et placer les flacons à l'étuve 37 °C pour au moins 48h (control de stérilité) et conserver les flacons au réfrigérateur à +4° C

Avant utilisation, ramener à 37 °C au bain marie et enfin ont ajouté le S.V.F.

En peut préparer une plus grande quantité de milieu, en respectant la proportion des additifs (bicarbonate de sodium et antibiotique).

II.2. Repiquage de la lignée cellulaire BSR

Le repiquage est comme le changement de milieu, une opération à pratiquer régulièrement pour entretenir la culture cellulaire in vitro. Pour maintenir la culture, il faut procéder au repiquage des cellules, c'est à dire leur transfert dans y de nouveaux récipients et dans du milieu neuf, à une Densité cellulaire inférieure à celle de la confluence, cette procédure consiste à :

II.2.1. Observation des cellules au microscope inversé

Cette étape est nécessaire afin de vérifier que le tapis cellulaire est uniforme et confluent. Basé sur une observation d'aspect cellulaire sous microscope inversé gros $\times 10$.

II.2.2. Lavage du tapis cellulaire

Consiste à :

Eliminer le milieu de culture pour laver le tapis cellulaire en introduisant 2 ml de trypsine et agiter doucement la boîte pendant 30 secs en fin éliminer tout le liquide à l'aide d'une pipette Pasteur

II.2.3. Trypsination d'un flasque de culture cellulaire de 75 ml / 48 h

Introduction de 2 ml de trypsine 0,25 %. (La trypsine est une peptidase du suc pancréatique participant à la digestion des protéines. Il s'agit d'une protéase à sérine qui hydrolyse les liaisons peptidiques situées côté C d'un résidu de lysine ou d'arginine, qui sont des acides aminés basiques) et puis Répartir la trypsine sur tout le tapis cellulaire et laisser agir à l'étuve 37°C /10 mn.

Une observation toutes les 2 mn à l'œil nu et au microscope inversé pour surveiller le décollement du tapis cellulaire du support et l'individualisation des cellules qui deviennent rondes en fin l'arrêt de l'action de la trypsine dès le décollement et l'individualisation se sont produits

II.2.4. Arrêt de la trypsination

L'introduction de 3 ml de milieu de culture complété (l'action de la trypsine est stoppée par le SVF) et puis envoyer le liquide sur le fond du flasque pour finir le décollement des cellules

II.2.5. Numération et dénombrement des cellules sur Malassez

Prélèvement de 0,5 ml de suspension cellulaire dans un tube à hémolyse stérile afin de réaliser une numération sur cellule de Malassez afin d'effectuer le calcul à l'aide de la cellule de Malassez.

II.2.5.1. Description

Volume du quadrillage total : 1 μ l

Dimensions d'une bande : L : 2,5 mm, l : 2 mm, H (ou profondeur) : 0,20 mm Constitué de : 100 rectangles d'égales surfaces

Pour obtenir une numération proche de la réalité, il est important de :

Ne pas rayer le quadrillage lors du nettoyage de la cellule de Malassez.

Bien monter la lamelle sur la cellule de Malassez.

Déposer la goutte de l'échantillon à énumérer correctement.

Bien laisser sédimenter les particules à énumérer avant le comptage (Hilary et *al.*, 1974). .

II.2.5.2. Numération

Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).

Observer ensuite à l'objectif x40 pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).

Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite) (Hilary et *al.*, 1974). .

II.2.5.3. Calcul de la concentration cellulaire

Après avoir effectué la numération, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée. Soient :

n : nombre de cellules comptées

V : volume de comptage.

f : facteur de dilution.

N : nombre de cellules par microlitre (μl).

Si on a n cellules dans V microlitre litres, alors on a N cellules dans un microlitre :

$$N \times V = n \times 1 \quad \text{donc} \quad N = n / V$$

Si la solution avait été diluée :

$$N = (n / V) \times f$$

II.2.6. Mise en culture dans de nouvelles flasques

Calculer le volume de suspension cellulaire et le volume de milieu à introduire dans chaque flasque de sorte que les cellules en culture sont placées à une densité finale de 5 millions de cellules par 10 ml de milieu et puis Incuber dans l'étuve humide à 37°C et à 5% CO₂ pendant 4 à 5 jr.

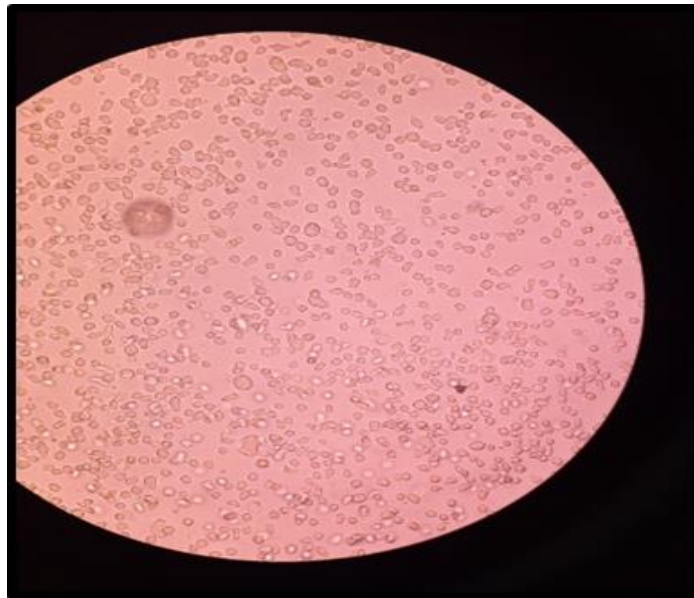


Figure 17 : les cellules BSR sous microscope avant la trypsination inversé gros×20 (originale, 2019)

II.2.7. Entretien

Observation de milieu de culture et les cellules tous les 2 js. Pour effectuer le repiquage lorsque les cellules sont à confluence.

II.3. Décongélation

Les aliquotes contenant les suspensions virales congelées qui titre 2,33, sont récupérés puis transférés immédiatement dans de l'eau froide à 4°C. Après avoir effectué une décongélation complète.

II.4. Infection *In-vitro* de la culture cellulaire par le virus LPS

Le modèle de croissance du virus adapté aux cellules a été étudié dans des cellules BSR en utilisant 0,1 multiplicité d'infection (MOI) du virus.

Etant donné que le volume viral de 2 ml de titre 2,33, et nous savons que 0,1 DL₅₀ correspond à une cellule

On a procédé au calcul suivant :

$$\left[\begin{array}{l} 0,1 \text{ DL}_{50} \rightarrow 1 \text{ cellule} \\ 10^{-2,33} \rightarrow x \text{ cellule} \end{array} \right.$$

Donc :

$$\begin{cases} 0,1 \text{ DL}_{50} \rightarrow 1 \text{ cellule} \\ 213 \text{ DL}_{50} \rightarrow X_1 \text{ cellule} \end{cases}$$

$$X_1 = 2130 \text{ cellules} \leftrightarrow X_1 = 2 \times 10^3 \quad \longrightarrow \quad \begin{cases} 2 \text{ ml} \rightarrow 2 \times 10^3 \\ 2 \text{ ml} \rightarrow 4 \times 10^3 \end{cases}$$

Après les calculs sur cellule de Malassez, le nombre de cellule est 5×10^6 cellules

Effectuer la dilution 1/1000

$$\begin{cases} 5 \times 10^6 \rightarrow 1000 \mu\text{l} = 1 \text{ ml} \\ 5 \times 10^3 \rightarrow X_2 \end{cases}$$

$$X_2 = 0,1 \text{ ml} \quad \text{Donc} \quad 10 \mu\text{l} \rightarrow 9,9 \text{ ml}$$

- Infection de 5×10^3 des cellules BSR par 2 ml de virus dilué à 10^{-2} .
- Laisser agir le milieu de culture pendant une heure pour une bonne adsorption
- Addition de 40 ml de milieu neuf
- Changement de milieu Après 24 h.
- Effectuer une nouvelle trypsination après 4 jrs.

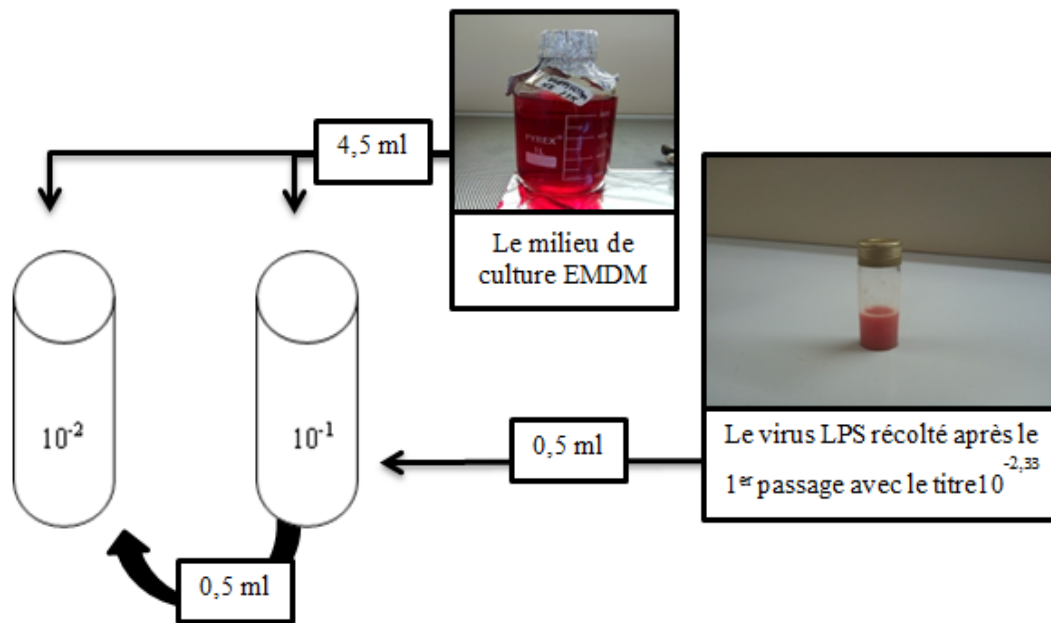


Figure 18 : Schéma explicatif de la dilution de virus rabique LPS (original, 2019)

II.5. Récolte

Récupération du milieu de culture infecté par le virus LPS par la suite réaliser une centrifugation réfrigéré de 1500 trs/mn /10 mn. à 4° C afin d'éliminer les débris cellulaire, après 48h Une 2^{ème} récolte.

II.6. Titrage sur souris (*In-vivo*)

C'est le test de virulence initiale. Le titrage d'une suspension virale (surnageant) consiste à évaluer le nombre des particules infectieuses par unité de volume en calculant la DL₅₀. Chaque dilution est administrée par voie intracérébrale à un groupe de souris pesant (15 ± 1 g) à raison de 0.03 ml/souris.

II.6.1. Préparation de l'inoculum

Préparer 4 tubes préalablement stérilisés et fermés à l'aide d'un coton cardé pour mettre 4.5 ml de milieu de culture DMEM dans chaque des tubes à l'aide d'une seringue Cornwall. Et puis prélever 0.5 ml de la suspension virale et la transférer dans les 4.5 ml de milieu de culture DMEM complété pour obtenir une première dilution à 10⁻¹

Procéder à des dilutions successives jusqu'à obtention d'une dernière dilution à 10⁻⁴ (Fig.19) afin d'Inoculer les souris avec les dilutions : 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹ et avec la suspension virale pure à l'aide d'une seringue à insuline

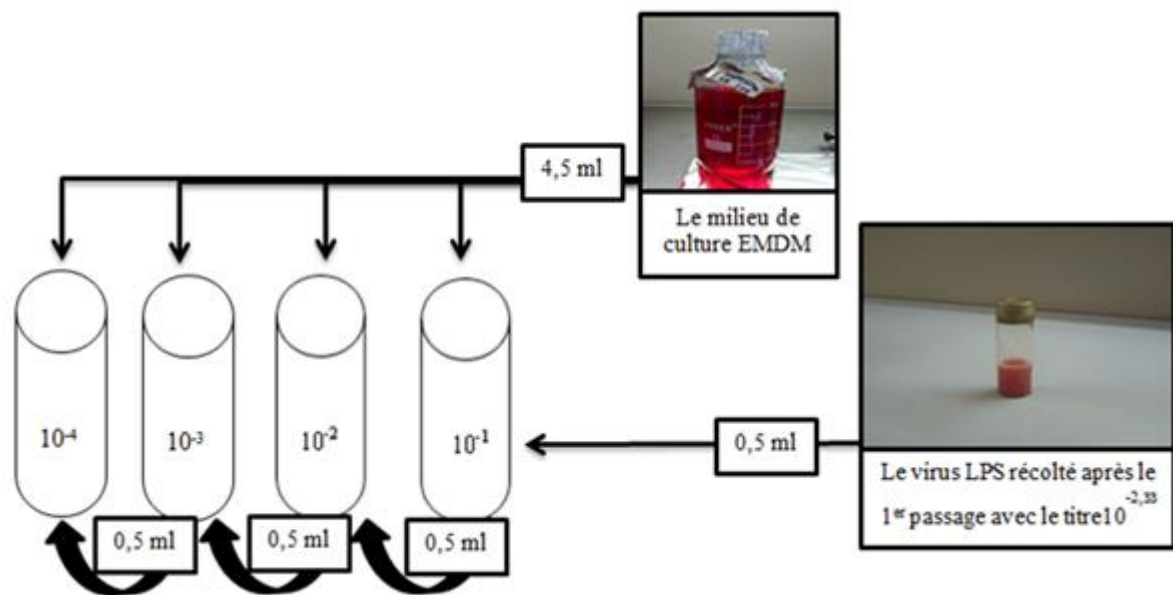


Figure 19 : Schéma explicatif des dilutions de la suspension virale (original, 2019)

II.6.2. Mode opératoire

Mettre sur la paillasse une grille qui servira à maintenir les souris immobiles au moment de l'inoculation. Préparer 5 cages à souris dont chacune est munie d'une étiquette comportant le numéro du lot de vaccin, la dilution, et la date de l'inoculation. Le volume injecté est de 0.03 ml.



Figure 20 : Inoculation de la suspension virale par voie intracérébrale (original, 2019)

Chaque cage contiendra dix souris inoculées par la dilution mentionnée sur l'étiquette.

L'inoculation se fera à partir de la concentration la plus faible.



Figure 21 : Cages contenant les souris inoculées par les différentes dilutions de suspension virale (original, 2019)

II.6.3. Exemple de calcul d'un titre virale de 5^{ème} passage

Les résultats de l'épreuve sont disposés en colonnes indiquant le nombre de souris qui survivent ou qui succombent pour chaque dose du virus (le nombre de souris inoculées = 10 et le facteur de dilution = 10).

Après avoir noté le nombre de souris mortes par la rage, on calcule la DL50 par la méthode de Spearman & Karber (Karber, 1931).

Dilution du virus	Souris survivantes	Souris mortes
10^{-4}	0	10
10^{-5}	3	7
10^{-6}	10	0

La plus faible dilution de virus pour laquelle toutes les souris sont positives (mortes) est 10^{-4} , donc Log_{10} de l'inverse cette dilution est égale à 4.

La somme des souris positives à la dilution définie à l'étape (1) et à toutes les dilutions supérieures est de $10 + 7 + 0 = 17$

La valeur numérique attribuée à 17 souris mortes d'après le tableau de variation numérique des titres viraux (annexe 3) est de 1,2.

Log_{10} de l'inverse de la dilution point

$$50\% = \text{Log}_{10} 4^{1,2}$$

$$= \text{Log } 10^{5.2}$$

Log_{10} de la dilution point 50% = $\text{Log } 10^{-5.2}$

II.7. Titrage d'immunofluorescence direct

C'est la technique de référence. Les antigènes rabiques présents dans le tissu cérébral sont appliqués sur une lame et fixés par l'acétone, puis reconnus spécifiquement par des immunoglobulines anti-nucléocapside rabique couplées à la fluorescéine. Une réponse positive est révélée par la présence dans la préparation d'inclusions fluorescentes en lumière ultraviolette, de formes et de tailles variables. Elle peut être effectuée sur des empreintes de cerveau (corne d'Ammon) ou sur des produits biologiques obtenus intra-vitam (empreintes cornéennes, frottis salivaire, LCR) (Hoen *et al.*, 1990).

II.7.1. Mode opératoire

Le conjugué doit être dilué dans du tampon phosphate à Ph 7,2 avant utilisation, la dilution la plus appropriée doit être établie par titrage du conjugué Anti-nucléocapside Rabique. A titre d'information, une dilution au 1/20 est généralement considérée comme satisfaisante.

On a utilisé la suspension virale récoltée par le 4^{ème} passage qui titre 4,40 et les cellules BSR toujours comme support cellulaire.

Effectuer des dilutions de la suspension virale de 10^{-1} à 10^{-6} (Fig. 22), et préparer la suspension cellulaire 10^6 cellules/ml ; sur la plaque, remplir les puits par suspension cellulaire, à partir de chaque dilution rajouter une goutte de la suspension virale dans chaque puits et laissez glisse à sécher à l'air complètement (Fig. 23).

Laisser 1 puits pour le témoin viral et autre pour le témoin cellulaire et Incuber les puits a 37°C /48h.

Après 48h d'incubation, Laver les cellules avec du tampon phosphate et fixer les cellules à l'acétone à -20°C /20 mn, retirer la lame de l'acétone et laisser sécher les cellules à l'air complètement avant la coloration, et puis ajouter suffisamment de conjugué antirabique dilué par le PBS pour couvrir la lame.

Effectuer une Incubation à 37°C pendant 30 mn à chambre humide, par la suite lavage en tampon phosphate 2 fois /20 mn et ajouter quelques gouttes de glycérine tamponnée, en fin réaliser une lecture sous microscope optique à fluorescence (Hilary *et al.*, 1974).

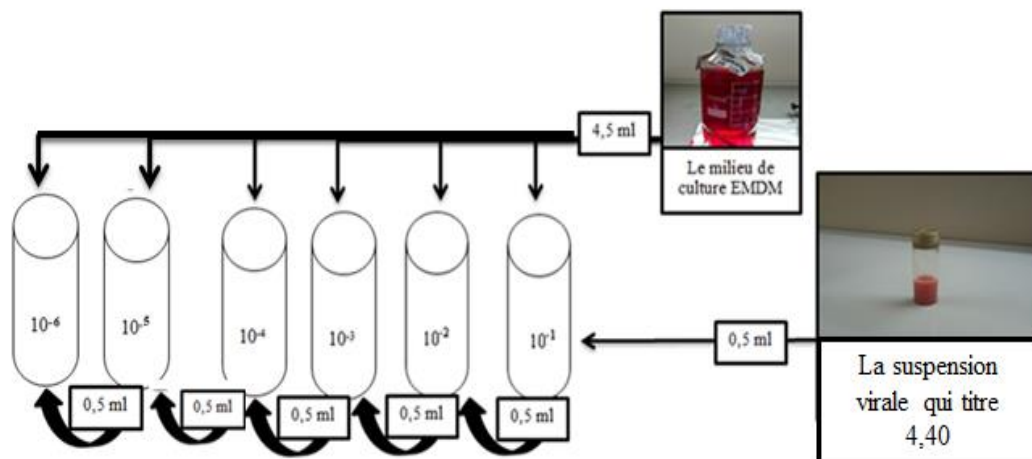


Figure 22 : les dilutions de suspension virales (original, 2019)

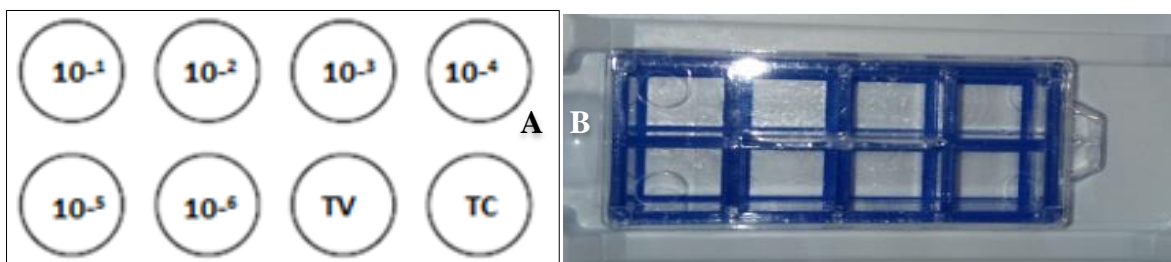


Figure 23 : plaque a récipients (puits) pour culture cellulaire (original, 2019)

II.8.Exemple de calcul du titre viral final par la méthode de Karber

On a utilisé la suspension virale récolté après le 4^{ème} passage car la suspension devienne plus clarifier, par contre les suspensions du 1^{er} 2^{ème} et 3^{ème} passage contenant les débris cellulaire qui inhibent l'apparition de la fluorescence.

$$\text{Log10 dilution terminale} = -X - d \left(\sum \frac{r_i}{n_i} - 0.5 \right)$$

1. **X** : log10 de l'inverse de la plus faible dilution celle pour laquelle tous les puits sont positifs. Dans ce cas : **X = log 10⁻⁽⁻⁴⁾ = log 10⁺⁴ = +4.**
2. **d** : log10 de facteur de dilution, **d = log 10 = 1.**
3. **ni** : nombre des puits utilisées à chaque dilution après soustraction des puits éliminés dans ce cas **ni = 8 (8 puits).**
4. **ri** : nombre des puits positifs (parmi ni) dans ce cas **ri = 4.**

$$\text{Donc } \text{Log}_{10} \text{ D.T.} = -4 - 1\left(\sum \frac{4}{8} - 0.5\right)$$

$$\text{Log}_{10} \text{ D.T.} = -4 \quad \text{D.T.} = 10^{-4}$$

D'où on peut calculer ce titre : $T = 10^{-(4)}$

$$T = 10^4 \text{ DL}_{50} / 100 \mu\text{l.}$$

$$T = 10^5 \text{ DL}_{50} / \text{ml.}$$

Anticorps : molécule protéique (immunoglobuline) spécifique produite par l'organisme en réponse à l'introduction d'un antigène.

Antigène : molécule d'origine biologique, naturelle ou synthétique, étrangère à l'organisme (ou reconnue comme telle par celui-ci) qui provoque une réaction immunitaire.

Antirabique : contre la rage.

Antiviral : contre le virus.

Biopsie : prélèvement sur le sujet vivant d'un fragment de tissu ou d'un organe dans le but d'effectuer une étude anatomo-pathologique.

Challenge : test d'épreuve.

DL₅₀ : la dose létale est un indice du degré de toxicité aigüe d'une matière active. Cette valeur exprime la dose qui est mortelle pour 50 % d'un groupe expérimental d'organismes exposés.

Encéphalomyélite : inflammation généralisée du système nerveux central, le plus souvent d'origine virale.

Enzootie : maladie épidémique, qui n'atteint que les animaux d'une seule localité ou d'une seule exploitation, soit en permanence, soit en certaines époques.

Génotype : ensemble des constituants génétiques d'un organisme, qu'ils soient exprimés ou non.

Immuno-génicité : c'est la capacité pour toute substance, soluble ou particulaire, protéique ou non, habituellement étrangère à l'organisme dans lequel elle se trouve, de provoquer une réponse immunitaire spécifique.

Incubation : temps qui s'écoule entre la pénétration d'un micro-organisme pathogène dans l'organisme et l'apparition de premiers signes cliniques.

Inoculation : introduction dans l'organisme, après que celui-ci ait subi une lésion ou une brèche de ses éléments de protection (peau, système immunitaire). Le mot inoculation s'utilise essentiellement pour traduire la pénétration dans l'organisme de germes (bactérie, virus, etc.) ou de toxines (substance libérée par une bactérie pathogène) par exemple.

Monocaténaire : acide nucléique constitué d'une seule chaîne de nucléotides. L'ARN messager est monocaténaire.

Neurotrope : qui se fixe électivement sur le système nerveux.

Vaccin : est une préparation capable d'apporter à un sujet réceptif à une maladie donnée, une protection immunitaire vis-à-vis de cette maladie.

Vaccination : est un procédé qui consiste à introduire un agent infectieux extérieur (bactérie ou virus), vivant atténué ou tué, ou une fraction de ces agents, dans un organisme vivant afin de créer une réponse immunitaire de type humorale ou cellulaire ou les deux à la fois.

Vaccin inactivé : est un vaccin où l'agent bactérien ou viral est entier et inactivé par un procédé chimique ou physique qui le rend non infectieux, mais capable de stimuler une protection immunitaire efficace.

Zoonose : désigne les maladies infectieuses ou parasitaires affectant principalement les animaux, transmissibles à l'homme par les animaux et réciproquement.

la multiplicité d'infection ou MOI : En microbiologie, est le rapport agents (par exemple, phage ou plus généralement virus, bactéries) aux cibles d'infection (par exemple, cellules). Par exemple, lorsque vous vous référez à un groupe de cellules inoculées avec des particules virales, la multiplicité d'infection ou MOI est le rapport entre le nombre de particules virales et le nombre de cellules cibles présentes dans un espace défini.

I. Résultats

I.1. Repiquage de la lignée cellulaire BSR (BHK-21)

Après la période d'incubation les boîtes inoculées et en comparaison avec la boîte témoin, montre des modifications remarquables sur la nappe cellulaire, dont les cellules dans le flasque ont poussé et couvert tout le substrat de culture disponible, formé un tapis cellulaire monocouche, uniforme et confluent.

I.2. Adaptation de virus LPS sur les cellules BSR

I.2.1. Infection cellulaire

Le virus rabique, souche LPS est totalement adsorbé par les cellules BSR à travers une période d'incubation de 96 h, et donc fortement favorise la réplication virale. Ce qui permet de récupérer une quantité importante des particules virales.

I.2.2. La récolte

Après 4 à 5 js d'incubation des boîtes inoculées, les suspensions virales récoltées sont clarifiées par centrifugation à 2500 tr/mn à +4°C /10 mn. Le surnageant est conservé à -20°C pour les inoculations des passages ultérieurs et pour l'évaluation du titre viral.

I.3. Résultat après l'entretien des cellules

I.3.1. Variations du pH

La surveillance de la couleur du milieu de culture contenu dans des boîtes assurée par la réaction du rouge de phénol ; le milieu de culture DMEM qui est rouge à l'origine devient jaune lorsque le milieu devient acide.

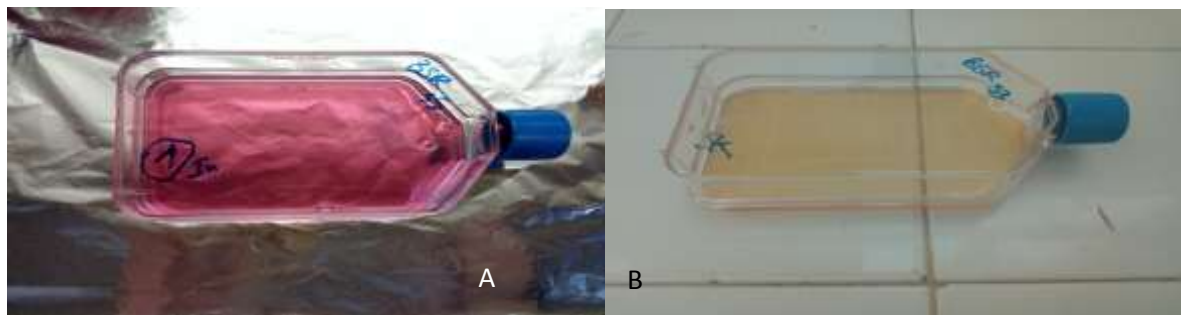


Figure 24 : Variation du pH dans le milieu de culture (original, 2019)

I.3.2. Observations sous microscope photonique inversé.

Les observations microscopiques permanentes nous permettent de suivre le développement du tapis et sa confluence pour éviter les fausses trypsinations.

Ces observations nous permettent aussi d'étudier la morphologie des cellules au cours de leurs proliférations. On peut distinguer les contaminations avancées à l'œil nu car dans ce cas le milieu de culture devient trouble.

I.4. Résultats d'inoculation des souris par le virus LPS de 2^{ème} passage au 5^{ème} passage

Au cours des passages d'adaptations toutes les souris sont observées pendant 14 js. à partir du jour de l'inoculation d'épreuve. Seules les souris mortes survenant après le 5^{ème} j. et celles précédées par des signes de rage à virus fixe (paralysie, convulsion) sont considérées comme dues à la rage. Les paralysies survenant chez les souris survivant après le 14^{ème} j d'observation sont considérées comme équivalent à la mort par la rage (annexe 4).

Tableau 4 : Résultat du 2^{ème} passage d'inoculation des souris

Dilution du virus	Souris survivantes	Souris mortes
10 ⁻¹	0	10
10 ⁻²	0	10
10 ⁻³	0	10
10 ⁻⁴	0	10

Tableau 5 : Résultat de 3^{ème} passage d'inoculation des souris

Dilution du virus	Souris survivantes	Souris mortes
10 ⁻¹	0	10
10 ⁻²	0	10
10 ⁻³	0	10
10 ⁻⁴	1	9
10 ⁻⁵	2	8

Tableau 6 : Résultat de 4^{ème} passage d'inoculation des souris

Dilution du virus	Souris survivantes	Souris mortes
10 ⁻¹	0	10
10 ⁻²	0	10
10 ⁻³	0	10
10 ⁻⁴	0	10
10 ⁻⁵	1	9

Tableau 7 : Résultat de 5^{ème} passage d'inoculation des souris

Dilution du virus	Souris survivantes	Souris mortes
10 ⁻¹	0	10
10 ⁻²	0	10
10 ⁻³	0	10
10 ⁻⁴	0	10
10 ⁻⁵	3	7
10 ⁻⁶	10	0

I.5. Résultat de l'exemple de calcul d'un titre virale de 5^{ème} passage

La dilution point 50% (DL_{50}) = $10^{-5,2}$

Le titrage des suspensions virales récoltées et clarifiées est effectué après chaque passage d'adaptation sur cellules BSR. Les titrations ont donné les résultats représentés dans le tableau et le graphe ci-dessous et exprimés en DL_{50}/ml par rapport aux passages.

Tableau 8 : Résultats du titrage des suspensions virales récoltées au cours des passages d'adaptation

Passages	Titrage sur souris DL_{50}/ml
Titre initial	$10^{2,33}$
Titre de 2 ^{ème} passage	$10^{4,5}$
Titre de 3 ^{ème} passage	$10^{5,40}$
Titre de 4 ^{ème} passage	$10^{4,40}$
Titre de 5 ^{ème} passage	$10^{5,2}$

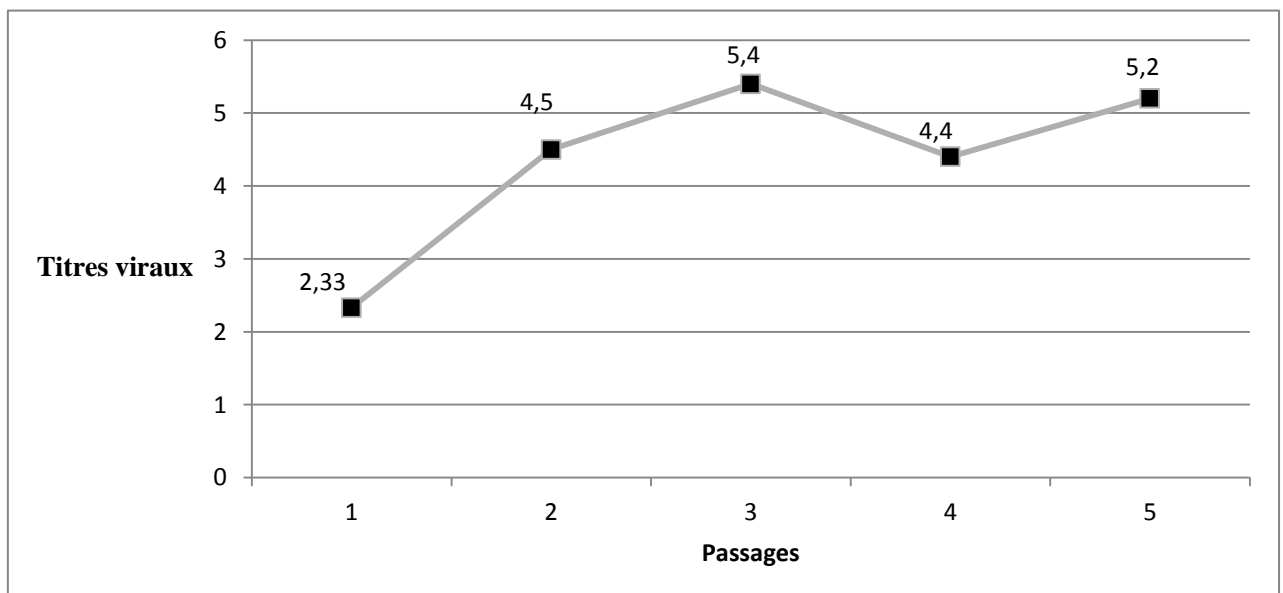


Figure 25 : Cinétique du titre viral au cours des passages d'adaptation

I.6. Calcul du titre viral par la technique d'immunofluorescence IF

Après l'examen microscopique, la surface totale de chaque puits est observée. La méthode de lecture est qualitative : si le puits ne contient aucun foyer fluorescent, le résultat est négatif, si un ou plusieurs foyer fluorescents sont observés, le résultat est positif (Fig.26)

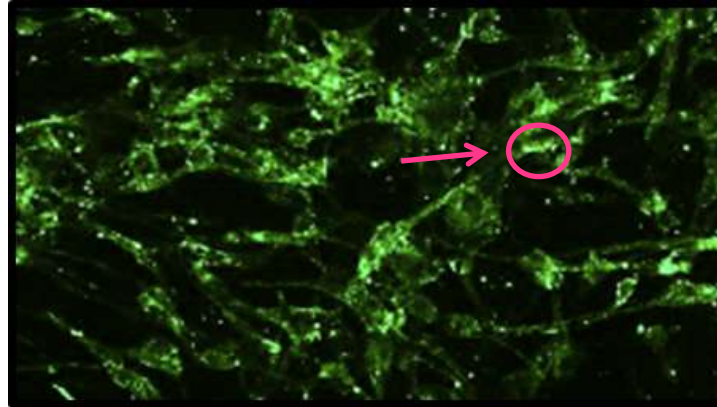


Figure 26 : Détection du virus rabique dans des cellules BSR. Fluorescence observée dans un cytoplasme de cellules vivantes infectées par le virus (Shuyun Qin, 2019)

Donc on a obtenus les résultats suivants :

Tableau 9 : résultat de titrage par la technique d'immunofluorescence

Dilutions	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	TV	TC
5 ^{eme} Passage	20/20	20/20	20/20	6/20	0/20	00/20	+	+

TV : témoin viral

TC : témoin cellulaire

I.7. Résultat du calcul le titre viral final par la méthode de Karber

T= 10^5 DL50 /ml.

II. Discussion générale

L'utilisation de cultures tissulaires pour la croissance du virus de la rage a été décrite pour la première fois en 1913. Jusqu'à récemment, il avait été largement supposé que les souches du virus de la rage s'adaptent lentement à la croissance *In-Vitro*.

Par conséquent, cette procédure n'avait pas été utilisée comme procédure de diagnostic de routine. En 1978, Smith et *al.* ont démontré que les souches du virus de la rage pouvaient être facilement isolées dans les cellules neuroblastomes murin. En 1980, Rudd et *al.* ont montré que les cellules BSR sont aussi sensibles aux souches de virus rabique.

L'isolement et la propagation efficaces des virus en culture dépendent de la densité cellulaire, avec la concentration des particules virales, la compétition se produit à l'intérieur des cellules, et dans ces conditions, un excès de virus réduit la croissance. En revanche, une faible concentration de particules virales implique la propagation de l'infection dans la culture cellulaire et donc fortement favorise la réplication virale (Licari et Bailey, 1991).

Le cycle de vie de virus rabique est entièrement cytoplasmique. L'entrée virale est initiée par l'interaction entre les récepteurs cellulaires et la glycoprotéine virale. Après que le virus se soit fixé à la membrane cellulaire, il pénètre dans la cellule par la voie endocytose (Gaudin et *al.*, 1993).

Par la suite, le décollement du génome virale se produisant dans le cytosol (Mire et *al.*, 2010). La transcription a lieu dans une usine spécialisée à virus, le corps Negri, (Lahaye et *al.*, 2009).

La protéine G est transférée dans le réticulum endoplasmique, tandis que les 4 autres protéines virales sont synthétisées sur des ribosomes libres, vraisemblablement à proximité des corps d'inclusion (Gaudin, 1997). Après la réplication, les virions intacts sont assemblés avec l'ARN génomique et les protéines dans le corps d'inclusion puis une libération extracellulaire se produit via le bourgeonnement (Albertini et *al.*, 2011).

Dans cette étude les suspensions récoltées et titrées après la réalisation du 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} passage d'adaptation ont donné des titres de 2,33 DI_{50} /ml, 4,50 DI_{50} /ml, 5,40 DI_{50} /ml, 4,40 DI_{50} /ml, 5,20 DI_{50} /ml, respectivement (Figure 24). On remarque que le titre viral augmente relativement avec l'avancement des passages. Ceci est probablement due au fait que les cellules BSR deviennent plus permissives car le virus est devenu de plus en plus adapté avec ce support cellulaire.

D'autre part, ce titre viral diminue au 4^{ème} passage, cet abaissement est le résultat de changement d'un paramètre qui est un manque d'un jour dans la période de la récolte (récupération de surnageant après 3^{ème} jrs au lieu 4^{ème} jrs) donc le surnageant récupéré et utilisé dans la préparation de l'inoculum de 4^{ème} passage ne contient pas suffisamment de particules virales. L'idéal est de récolter les boîtes des cellules infectées par le *Rabdhovirus* après le 4^{ème} js. d'infection (Hilary et al., 1974).

Il a été rapporté que le temps nécessaire pour une récolte optimale variait de 2 à 7 js en fonction de la souche virale, du niveau d'adaptation, de la température de propagation (33–37 ° C) et de la MOI (0,1-0,01) (Guo et al., 2014).

La réplication de virus rabique en culture cellulaire produit des titres viraux faibles en raison de la réplication lente de ce virus dans les cellules BHK-21 (Cunha et al., 2010).

Dans notre étude, il a été observé que le moment de la récolte optimale était (96 h) avec un inoculum initial de (0,1 MOI). Des observations similaires ont également été rapportées par (Hurisa et al., 2013) pour Evelyn Rokitniki Abelseth (ERA) de la souche du virus de la rage en utilisant la lignée de cellules Vero. Dans une autre étude ont montré que le titre viral le plus élevé (3×10^8 FFU/ml) a été atteint lorsque les cellules ont été infectées à une faible multiplicité d'infection MOI.

Kallel et al., en (2003) ont également testé 2 valeurs de MOI différents (0,07 et 0,046) pour la vaccination des cellules BSR contre la rage et ont obtenu des résultats satisfaisants. On peut dire que ces paramètres ne sont pas standards et peuvent être varié d'une étude à une autre.

Les résultats obtenus à travers les passages de titrage sur souris (la mort des souris après l'inoculation par la suspension virale) et par la technique d'immunofluorescence (l'apparition de la fluorescence) confirment que les cellules BSR sont sensibles à l'isolement virus de la rage.

Nos résultats peuvent être expliqués en partie par le fait que les cellules BSR contiennent un catalogue de récepteurs de surface similaire à celui de cerveau de souris normal (Schachner, 1973).

Selon les recommandations de l'OMS, les souches de virus dont le titre est supérieur ou égal à 10^6 DL₅₀ / ml peuvent être utilisées comme souche vaccinale (Anonyme, 2005)

En comparant le titre viral maximal obtenu dans notre étude qui est $10^{5,2}$ DL₅₀/ml après confirmation de cette valeur par le résultat de la technique d'immunofluorescence directe.

Donc nous avons adapté la souche LPS du virus de la rage dans la lignée cellulaire BSR par des passages en série.

Mais pour pouvoir passer à l'échelle de la production avec ce nouveau support cellulaire étudié, il faut aller au maximum possible de passages d'adaptations de la souche vaccinale LPS sur cellules BSR pour pouvoir enfin récolter une suspension virale plus adaptée avec un meilleur titre viral et ce en accord avec les recommandations de l'OMS et avec d'autres auteurs (Chaudhary, 2009) et qui sont arrivées à réaliser un nouveau vaccin contre la rage après avoir effectué 10 passages d'adaptation d'une souche vaccinale appelée CVS-11 de virus de la rage d'origine souris sur cellules BSR étant considérée comme le principal virus international de provocation utilisé au niveau mondial (Anonyme, 2007). Il s'agit d'une souche bien caractérisée, développée à partir du virus de la rage d'origine Pasteur (isolé en 1882) par adaptation chez la souris.

Les résultats de cette étude étaient également en accord avec la recommandation de l'OIE concernant la production du virus CVS si en utilisant des paramètres de croissance similaires (Anonyme, 2013).

Nos résultats restent préliminaires et doivent être suivis par d'autres jusqu'à l'obtention des résultats permettant de passer à l'échelle de production.

Conclusion et perspectives

A partir de cette étude on conclut que les cellules BSR peuvent être utilisées comme un support pour la production du vaccin antirabique car les résultats préliminaires trouvés sont significatifs et montrent que la souche vaccinale LPS peut être adaptée sur les BSR.

On peut dire aussi que l'augmentation continue du titre viral avec l'avancement des passages d'adaptation peut donner une idée vers l'obtention d'un titre viral qui peut atteindre des valeurs souhaitables dans les prochains passages d'adaptation.

Si cette étude peut nous garantir la possibilité de faire passer la production du vaccin antirabique sur BSR, les avantages seront essentiellement économiques (la réduction du coût et de la durée de la production) et éthiques (en évitant l'utilisation des cerveaux de souris d'où le vaccin tissulaire est fabriqué).

Dans ce contexte, les perspectives de ce travail seront de continuer ce travail jusqu'à la réalisation d'un lot de vaccin expérimental effectué sur les cellules BSR suivi par des essais cliniques pour ce qui est de l'étude d'innocuité, d'efficacité, de contrôle physico-chimique et microbiologique et aussi du pouvoir protecteur.

En revanche, une comparaison entre les résultats de cette étude (faite sur BSR avec d'autres études faites sur d'autres supports cellulaires (Costa, 2005) comme les cellules de rein de mouton immortalisées (R.M.I.), les cellules TIGEF (T-Immortalized Goat Embryo

Fibroblasts) (Da Silva Teixeira, 1997) et les cellules TIGMEC (T-Immortalized Goat Milk Epithelial Cells) (Mselli-Lakhal, 1999) semble très utile pour le choix d'un meilleur support cellulaire convenable pour produire ce vaccin.

Pour faire de cette production un projet d'avenir concret, il faut suivre les nouvelles technologies qui consistent en la production des vaccins à ADN (Sánchez-Sampedro, 2015).

Références bibliographiques

- Aguèmon, C., 2016- *Rabies transmission risks during peripartum*, two cases and a review of the literature. *Vaccine*, vol.34, n°15, p.p.1752-1757.
 - Albert, E. 1896 - *Portrait of Dr. Emile Roux*.
 - Albertini, A. Ruigrok, R.W., Blondel. 2011- *Rabies virus transcription and replication*. *Adv. Virus Res.*79, p.p. 1-22.
 - Anne, F. 1986- *Actualité de la rage médecine /science*, vol.2, n° 6, p.p. 312-321.
 - Aubry P., Rotivel Y. 2003- *Comment protéger de la rage les populations vivant en zone tropicale en 2002 ?*, 2003, n° 56, p.p. 52-53.
-
- Benelmouffok A., 2004 - *Epidemiology of rabies in Algeria*. *Vét.* n°2, p.p.61-66.
 - Benhabyles N., 2008- *Épidémiologie de la rage en Algérie*. Institut National de santé publique, Ministère de la santé de la population et de la réforme hospitalière, 45p.
 - Bourhy H., 1994- *Diagnostic biologique de la rage*, C.R. 2^{ème} réunion des centres antirabiques, p.p.75-78.
-
- Chantal J., Blancou. J. 1985 - *Le virus rabique*. In : *Pasteur et la rage*. Paris: Rosset, p.p. 145-151.
 - Costa M., 2005- *Establishment and partial characterization of ovine synovial membrane cell line obtained by transformation with Simian Virus 40 T antigen*, *J. Virol Meth.*, n°12, p.p. 72-78.
-
- David D., 2002 - *Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains*, *Vet. Microbiol*, n° 87, p.p. 111-118.
 - Delmas O .2011- *Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses*, rev. francophone des laboratoires, n°430, 35 p.
 - Dorai H., Yun Seung K. Dawn E. Cherylann Ki. Chengbin L. David J. Gordon M. Michael J., 2009 - *Expression of anti-apoptosis genes alters lactate metabolism of Chinese Hamster ovary cells in culture*. *Biotech. Bioeng.*, n°3, 103 p.
 - Duigou A., 2005- *Maîtrise des procédés de culture cellulaire pour la production de vaccins*. Th. Doc., Fac. pharmacie, Univ. Hanri Polncare, Nancy 1, 145 p.
-

Références bibliographiques

- Evans J. 2012 - *Rabies virus vaccines: is there a need for a pan-lyssavirus vaccine*. Comité d'organisation mondiale de santé d'expert de la rage. Série de rapport technique 700. Genève 1984.
-
- Florence R., Laurent, D. Hervé B. 2013 -*Rabies médecine/sciences*, EDP Sciences, n° 1, vol 29, p.p.47-55.
-
- Gaudin Y., 1997. Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *J. Virol.* 71, p.p.3742-3750.
 - Gaudin Y., Ruigrok W., Knossow M., Flamand A., 1993- *Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion*. *J. Virol.* n° 67, p.p.1365–1372.
 - Geron H., Rossigno, I. Figaro, A., 1948, Archives Publié le 27/09/2017 à 18:59 En Alsace - *vaccination d'un enfant en présence de Louis Pasteur et du Dr Roux*. L'illustration est extraite de l'ouvrage «Belles images d'histoire», Rue des Archives.
 - Guo C., Wang C., Luo S., Zhu S., Li H., Liu Y., Zhou L., Zhang P., Zhang X., Ding Y., Huang W., Wu K., Zhang Y., Rong W., Tian H., 2014-*L'adaptation de souche du virus de la rage CTN-1 pour la croissance à haut titre dans des cellules d'embryon de poulet pour le développement d'un vaccin*. *J. Virol.*, n°11, 8 p.
 - Guyatt k., twin J., David P., Holmes E., Smith G ., Smith I., Mackenzie J., Young P., 2003 -*A molecular epidemiological study of Australian bat Lyssavirus* *J. Virol.*, n° 84, p.p. 485-496.
-
- Hemachudha T., 2013-*Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis and management*, vol.12, n°5, p.p. 498-513.
 - Hillary K., Martin M., Kaplan M.1974-la rage technique de laboratoire 3ème éditions OMS Genève, p.p.24-23.
 - Hoen B., Blancou J., Canton Ph., 1990 - *Epidémiologie, diagnostic et prophylaxie de la rage*, p.p.551-556.

Références bibliographiques

- Hurisa B., Mengeshaa A., Newayesilassiea B., Kergaa S., Kebedea G., Bankoviskyb D., Metlinc A., Urgaa K., 2013-*Production de vaccin antirabique basé sur la culture cellulaire en Éthiopie*. *Procedia Vaccinol*, n° 7, p.p. 2-7.

- John A. Ryan, Ph.D. 2007-*Introduction à la culture de cellules animales*, Corning Incorporated Life Sciences Tower 2, 4th floor 900 Chelmsford St. Lowell, MA 01851, USA; p.p.1-7.

- Kabouia R., 2007-*La rage. Cours des maladies infectieuses*. des sciences vétérinaires, EL- Khroub ,10p.
- Knobel DL., Cleaveland S., Coleman PG., Fevre EM., Meltzer MI., Miranda ME., et al. 2005- *Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia*. *Bull World Health Organization*, n°83, 360 p.

- Lahaye X., Vidy A., Pomier C., Obiang L., Harper F., Gaudin Y., et al., 2009- *Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: evidence that NBs are sites of viral transcription and replication*. *J. Virol.* n° 83, p.p. 458-487.
- Laurent D et Hervé B. 2011- *le diagnostic de la rage*. *Revue francophone des laboratoires*, N°430, 33 p.
- Lemahieu JC. et Decoster A. - *Virus de la rage*, FLM, 1 p.
- Levaditi M. 1913- *Virus rabique et culture des cellules in vitro*. *C.R. Soc. Biol.* n° 75, 505 p.
- Licari P., Bailey J.E., 1991- *Factors influencing recombinant protein yields in an insect cell-baculovirus expression system: multiplicity of infection and intracellular protein degradation*. *Biotech. Bioeng.* vol. 5, p.p. 238-246.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., 2005-. *Biologie moléculaire de la cellule* (5th Ed.), p.p. 236-237.

Références bibliographiques

- Mammette A., 2002- Virologie médicale, Collection AZAY, Presses Universitaires de Lyon, 80 Boulevard de la Croix Rouse, p.p.431-440.
 - Mengesha AA., Hurisa B., Tesfaye T., Lemme H., Niguse D., Wold GG, Kebede A., Mesele T., Urga K., 2014- *Adaptation des isolats du virus de la rage local à un titre de croissance élevé et détermination de la pathogénicité pour développer un vaccin canin en Éthiopie*. Journal de vaccins, n°5, 245 p.
 - Metallaoui A., 2009- *Rage : Historique et situation épidémiologique en Algérie*. Projet GCP/RAB/002/FRA. 32p.
 - Mire C., White J.M., Whitt M., 2010- temporal analysis of matrix protein and nucleocapsid trafficking during vesicular stomatitis virus uncoating. PLoS Pathog. 6, e1000, 994p.
 - Mselli-Lakha L., Chebloune Y., Mornex F., 1999- *Goat Milk Epithelial Cells Are Highly Permissive to CAEV Infection in Vitro*. INRA, E.V.L., Virology, n° 259, p.p. 67-73.
-
- Pierre A., 2005-*la rage*, médecine tropicale, pp .1-4.
-
- Richard A., Lockshin A., Zakeri Z., 2004- *Apoptosis, Autophagy, and more, The International Journal of Biochemistry & Cell*, n°6, p.p. 65-30.
 - Rotival Y. avril 2002-*une histoire de la vaccination contre la rage*, virologie, vol 6 n° 2.
 - Rudd R., V. Trimarchi C., Abelseth K. 1980 - *Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus*. J. Clin. Microbiol n° 12, pp 590-593.
 - Rupprecht CE., 2016-Current Status and Development of Vaccines and Other Biologics for Human Rabies Prevention. Expert Rev. Vaccines, vol.15, n°6,pp. 731-749.
-
- Sánchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejías-Pérez E., García-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M., 2015- *The Evolution of Poxvirus Vaccines*, Elliot J. Lefkowitz, Academic Editor and Chris Upton, Viruses, vol 7, n°4, p.p.1726–1803.
 - Schachner M., 1973 - *Serologically demonstratable cell surface specificities on mouse neuroblastoma C-1300*. Nature London New Biol, n° 243 p.p.117-119.

Références bibliographiques

- Shim E., 2009 - *Evaluating the cost-effectiveness of rabies post-exposure prophylaxis: a case study in Tanzania* Vaccine., vol. 27, n°51, p.p.7167-7172.
- Shuyun Qin, A., Dmitriy V., Elvira R., Christoph W., Matthias J. Schnellb,c, Vladimir C., Alena D. -2019,*new recombinant rabies virus expressing a green fluorescent protein: A novel and fast approach to quantify virus neutralizing* , Science Direct Biologicals,5p.
- Smith A. 1978-*Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures*. Intervirolog., n°9, p.p. 359-361.

-
- Trentesaux C., Riou JF., 2010- *Sénescence et immortalité cellulaire*, Bull. Cancer, vol .97, n°11, p.p. 83-1275.

-
- Veyssier P., 1993-*La rage*, épidémiologie, prévention, Rev. Prat, n° 43, p.p. 86-1183.
-

Les organisations / institutions

- FAO : American Type Culture Collection. Dominguez M., 2009- Renforcement de la surveillance et des systèmes d'alerte pour la fièvre catarrhale ovine, du Nil Occidental et la rage au Maroc, en Algérie et en Tunisie. GCP/RAB/002/FRA. 15p.
- FAO., 2009- Projet GCP/RAB/002/FRA : Historique et situation épidémiologique de la rage en Algérie in [http:// www.FAO.org](http://www.FAO.org)llection PO Box 1549 Manassas, VA 20108 USA.
- Institut Pasteur de France, 2003 -Epidémiologie et prophylaxie de la rage humaine p.p.1- 12.
- International Journal of Biochemistry & Cell, n°6, p.p. 65-30.
- OIE. 2013- Rage. Dans: Manuel OIE terrestre, p.p. 1-28.
- OMS. 2014- organisation medial de santé Rabies.
- OMS. Relevé épidémiologique hebdomadaire, 2018, 93e année no 16, vol 93, p.p 201-220 in <http://www.who.int/wer> consulté le 29 mars 2019.
- OMS., 2005 - Série de rapports techniques de l'OMS., Genève: Organisation mondiale de la santé, n°931, p.p. 1-87.

Références bibliographiques

- OMS., 2007 : Série de rapports techniques de l'OMS., Genève: Organisation mondiale de la santé, n°941, p.p. 1- 96.
- OMS., 2010 - Vaccin antirabique : note d'information de l'OMS. Relevé épidémiologique hebdomadaire, no 85, p.p. 309-320.
- OMS., 2014 : Prophylaxie post-exposition (PPE) recommandée par l'OMS en fonction du type de contact avec l'animal suspect.
- OMS., 2018 : Consultation OMS d'experts sur la rage, troisième rapport: Rapport technique de l'OMS, n ° 1012, Genève, (ISBN 978-92-4-121021-8).

Sitographie

- <http://www.who.int/>
- <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.03.002>
- <https://thumbs.dreamstime.com/b/virus-de-la-rage-39765495.jp>
- <dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.05.005>
- www.academie-veterinaire-france.org cross<http://nce.fr/>
- www.elsevier.com/locate/biologicals
- www.oie.int/
- <http://dx.doi.org/10.1002/bit>
- www.who.int/en
- www.corning.com/lifesciences

Tableau des tampons et les réactifs utilisés lors de l'expérimentation

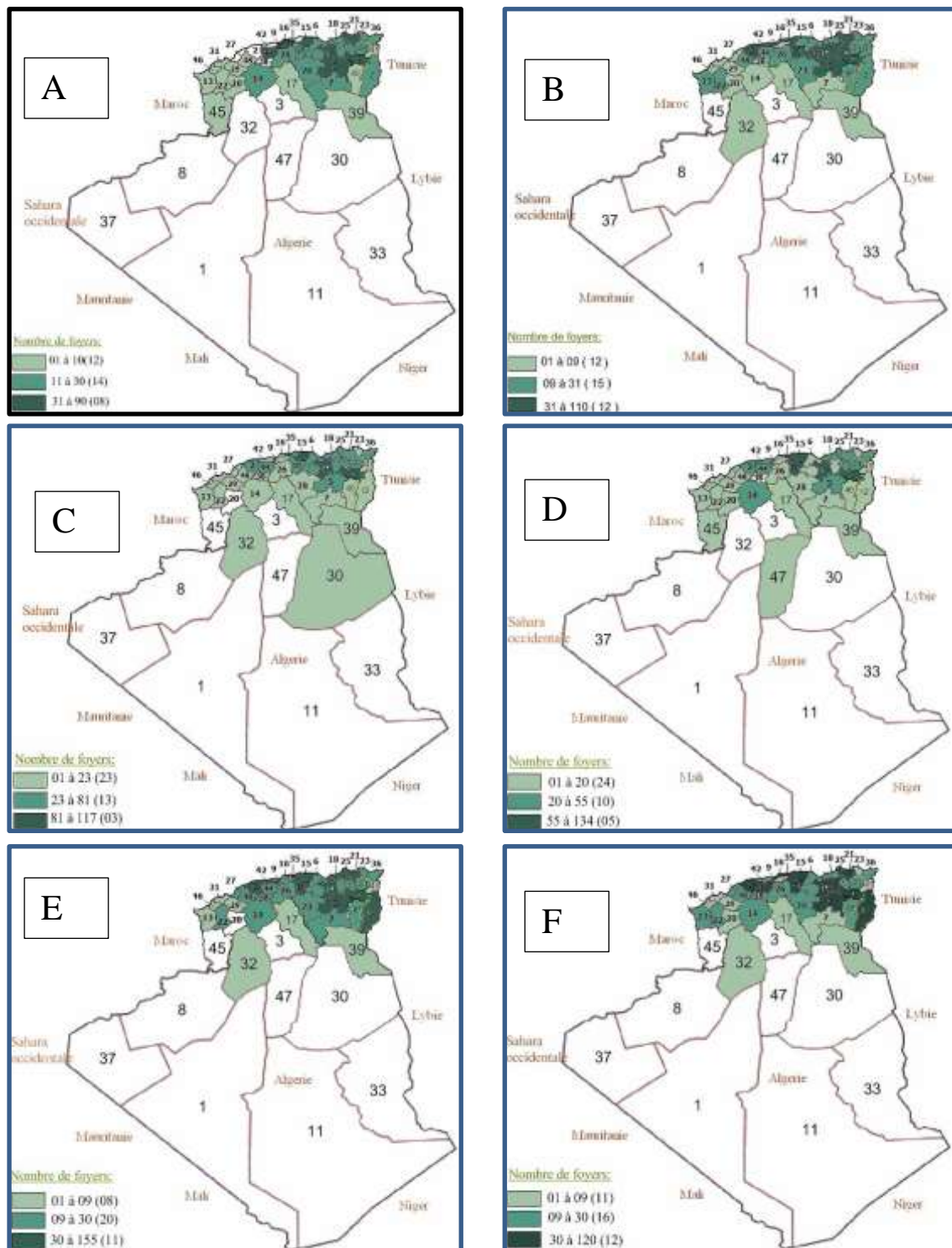
Les trompons et les réactifs
Le milieu DMEM
La trypsine
La glutamine
Les antibiotiques (pénicilline G et la streptomycine)
Acétone
Alcool
Conjugué antirabique a fluorescence

Tableau Appareilles utilisé lors de l'expérimentation

Les appareils
Agitateur magnétiques
Balance
Bec benzène
Centrifugeuse réfrigérée
Etuve (37°C)
Congélateur (-70°C)
Hotte à flux laminaire
Microscope inversé
Microscope a fluorescence

Tableau les verriers utilisé lors de l'expérimentation

Les verriers
Les tubes à essais
Pipettes pasteur
Flasques
Lame immunofluorescence
Seringue Cornwall
Cellule Malassez



A : Répartition des foyers de rage animale en Algérie en 2003

B : Répartition des foyers de rage animale en Algérie en 2004

C : Répartition des foyers de rage animale en Algérie en 2005

D : Répartition des foyers de rage animale en Algérie en 2006

E : Répartition des foyers de rage animale en Algérie en 2007

F : Répartition des foyers de rage animale en Algérie en 2008 (Metallaoui, 2009)

Tableau numérique pour le calcul des titres viraux

Nombre total des animaux positifs	Nombre des animaux Inoculés par dilution				
	N= 4	N=5	N=6	N=10	N=16
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10			0.35		
11		0.35	0.47	0.38	
12		0.49	0.58		
13		0.63	0.70	0.42	
14		0.77	0.82	0.45	
15	0.35	0.91		0.56	0.35
16	0.52	1.05	0.93	0.65	0.39
17	0.70		1.05	0.72	0.44
18	0.87	1.19	1.16	0.77	0.48
19	1.05	1.33	1.28	0.82	0.52
20	1.22	1.47	1.40	0.91	
21	1.40	1.61	1.51	0.98	0.57
22		1.75	1.63	1.05	0.61
23		1.89	1.75		0.69
24	1.57	2.03	1.86	1.12	0.73
25	1.75	2.17	1.98	1.19	0.74
26	1.92	2.31		1.26	0.79
27	2.10	2.45	2.10	1.33	0.83
28	2.27		2.21	1.40	0.87
29	2.45	2.59	2.33	1.47	0.92
30	2.62	2.73	2.45	1.54	0.95
31	2.80	2.87	2.56	1.61	
32	2.97	3.01	2.68	1.68	1.00
33	3.15	3.15	2.80	1.75	1.05
34		3.29	2.91		1.09
35		3.42	3.03	1.82	1.14
36	Pour chaque animal positif	3.56	3.15	1.89	1.18
37	en plus,	3.70		1.96	1.22
38	ajouter 0.175	3.84	3.26	2.03	1.27
39			3.38	2.10	1.31
40		Pour chaque animal positif	3.49	2.17	1.35
41		en plus,	3.61	2.24	1.40
42		ajouter 0.140	3.73	2.31	
43			3.84	2.38	1.44
44			Pour chaque animal positif	2.45	1.49
45			en plus,		1.53
			ajouter 0.1165	Pour chaque animal positif	1.57
				en plus,	1.62
				ajouter 0.07	Pour chaque animal positif
					en plus,
					ajouter 0.0437



Louis Pasteur (1822-1895), chimiste et biologiste français

Edelfelt Albert Gustaf Aristide (1854-1905)

Huile sur toile, 1885, Paris, musée d'Orsay

Introduction

Synthèse

bibliographique

Matériels et méthodes

Résultats
et discussion
générale

Conclusion
et
perspectives

