

N° d'ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

People's Democratic Republic of Algeria

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministry of Higher Education and Scientific Research



معهد العلوم البيطرية
of Institute Sciences

جامعة البليدة 1

University Blida-1



Mémoire de Projet de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

Purification et concentration du virus rabique
pour la production du vaccin antirabique

Présenté par

BOUSEDER Mounia

BOUABI Radjaa

Présenté devant le jury :

Président :	METREF Ahmed	MCA	ISV BLIDA
Examineur :	KHALED Hamza	MCA	ISV BLIDA
Promoteur :	AKLOUL Kamel	MCB	ISV BLIDA
Co-promotrice:	Djilani Salma	MAA	IPA

Année universitaire 2023/2024

BOUSEDER Mounia

BOUABI Radjaa

Université de Blida- 1 / Institut des Sciences Vétérinaires

Promoteur : Dr. AKLOUL Kamel

Résumé

La rage est une encéphalomyélite aiguë progressive et incurable provoquée par des virus neurotropes du genre Lyssavirus dont différentes espèces de mammifères agissent comme réservoirs et vecteurs.

La prophylaxie de la rage en Algérie est basée sur la production et l'utilisation d'un vaccin antirabique tissulaire.

Notre travail a pour objet de suivre le processus de la fabrication d'un vaccin antirabique cellulaire par l'utilisation d'une souche virale LPS (Louis Pasteur Saigon) et un support cellulaire BHK (baby hamster kidney) et les VERO (verda rénaux, rein vert).

L'évolution du vaccin antirabique Pasteur et les modifications chimiques qu'il a subies au fil du temps ont été étudiées, ainsi que le processus de fabrication de ce vaccin. Les différents types de vaccins antirabiques et leurs propriétés ont également été examinés.

Cette étude expérimentale, portant sur la production du vaccin à travers deux lignées cellulaires, a montré que le virus se développe facilement dans les cellules BSR, tandis que les cellules VERO posent des difficultés.

Concernant le titrage, les résultats obtenus ont été satisfaisants, ce qui encourage à approuver la méthode de la production du vaccin antirabique cellulaire.

Mots clés : Lyssavirus, vaccin cellulaire, cellule BHK (baby hamster kidney), souche virale LPS (Louis Pasteur Saigon).

BOUSEDER Mounia
BOUABI Radjaa

Université de Blida- 1 / Institut des Sciences Vétérinaires

Promoteur : Dr. AKLOUL Kamel

Summary

Rabies is an acute, progressive and incurable encephalomyelitis caused by neurotropic viruses of the Lyssavirus genus, for which various mammalian species act as reservoirs and vectors.

Rabies prophylaxis in Algeria is based on the production and use of a tissue-based rabies vaccine. The aim of our work is to follow the manufacturing process of a cellular rabies vaccine using a viral strain LPS (Louis Pasteur Saigon) and a cellular support BHK (baby hamster kidney) and VERO (verda rénaux, green kidney). The evolution of the Pasteur rabies vaccine and the chemical modifications it has undergone over time were studied, as was the manufacturing process for this vaccine. The different types of rabies vaccine and their properties were also examined.

This experimental study, which involved the production of the vaccine using two cell lines, showed that the virus develops easily in BSR cells, whereas VERO cells pose difficulties.

With regard to titration, the results obtained were satisfactory, encouraging approval of the cellular rabies vaccine production method.

Key words: Lyssavirus, cellular vaccine, BHK (baby hamster kidney) cell, LPS (Louis Pasteur Saigon) viral strain.

BOUSEDER Mounia
BOUABI Radjaa

Université de Blida- 1 / Institut des Sciences Vétérinaires
Promoteur : Dr. AKLOUL Kamel

Résumé

. داء الكلب هو التهاب دماغي حاد ومتقدم وغير قابل للشفاء تسببه فيروسات عصبية من جنس فيروسات الليسافيروس، والتي تعمل أنواع مختلفة من الثدييات كمستودعات ونواقل. يعتمد العلاج الوقائي من داء الكلب في الجزائر على إنتاج واستخدام لقاح داء الكلب القائم على الأنسجة. الهدف من عملنا هو متابعة عملية تصنيع لقاح داء الكلب الخلوي باستخدام السلالة الفيروسيّة LPS (لوييس باستور ساينغون) والدعم الخلوي BHK (كلية الهامستر الصغير) و VERO (فيردا رينو، الكلية الخضراء). تمت دراسة تطور لقاح داء الكلب باستور والتغيرات الكيميائية التي طرأت عليه مع مرور الوقت، بالإضافة إلى عملية تصنيع هذا اللقاح. كما تم فحص الأنواع المختلفة من لقاح داء الكلب وخصائصها. أظهرت هذه الدراسة التجريبية، التي نظرت في إنتاج اللقاح باستخدام سلالتين خلويتين، أن الفيروس يتطور بسهولة في خلايا BSR، بينما تشكل خلايا VERO صعوبات. وفيما يتعلق بالمعايرة، كانت النتائج التي تم الحصول عليها مرضية، مما يشجع على الموافقة على طريقة إنتاج لقاح داء الكلب الخلوي.

الكلمات الرئيسية: فيروس الليسافيروس، لقاح خلوي، خلية BHK (كلية الهامستر الصغير)، سلالة لوييس باستور ساينغون الفيروسيّة.

Remerciements

A Allah tout puissant qui nous a guidé et nous a donné la force et le courage pour réaliser ce travail du début jusqu'à la fin.

A notre professeur et promoteur Docteur Akloul Kamel d'avoir accepté la supervision de ce travail, sa disponibilité et sur tous ses conseils judicieux

Nous tenons à remercier nos membre de jury composé de Dr Metref Ahmed d'avoir accepté de présider le jury de notre travail et Dr Khaled Hamza d'avoir accepté de l'examiner, sincères remerciements.

Nous adressons aussi nos remerciements à notre Co-promotrice Madame Djilani Selma pour ses conseils et son soutien qu'elle nous a accordé tout au long de la période de formation.

Nos chaleureux remerciements à Mr Issad Directeur de production et au personnel de l'Institut Pasteur de KOUBA de nous avoir donné la chance de réaliser ce travail au sein de leur service et spécialement au personnel du laboratoire ; Mr Khadir Mouloud, Madame hadjira, Mr Boukhenfra et Mr Khorchef.

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

Dédicaces

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à :

Mes parents qui ont toujours été à mes côtés tout au long de mon parcours académique et personnel.

Ma mère Khadidja, ma source de force et d'inspiration. Ton amour inconditionnel, ton soutien et tes innombrables sacrifices m'ont permis de poursuivre mes rêves et de surmonter tous les obstacles.

Mon père, pour ton soutien constant, tes encouragements et tes conseils avisés. Ton amour et ta confiance inébranlable ont été ma force motrice. Ce travail est autant le vôtre que le mien, car sans vous, rien de tout cela n'aurait été possible.

Ma chère tante Tata Mina, mon bras droit qui a été avec moi depuis le début de mon parcours et m'a toujours encouragée à avancer.

Ma petite sœur Mimi, ma princesse, et mon frère Riadh, mon prince, qui ont toujours cru en moi.

Mes chères amies : Wiam ma sœur, Aya mon amie d'enfance, Chaima, Sarah, et Radjaa, qui ont partagé avec moi des moments de travail, de joie, de doute et de réussite.

Ma copine Nesrine, pour son soutien, son aide et son temps
Précieux qu'elle était toujours présente

Ma chère binôme Radjaa, qui a partagé avec moi toutes les émotions lors de la réalisation de ce travail.

Mounia Bouseder

Dédicaces

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers.

A la mémoire ma mère qui m'a quittée voilà sept ans que dieu la garde dans son paradis, et à qui j'aurais souhaité partager ma graduation avec elle.
J'espère que je vous ai rendu fiers de moi

A mon père quoi que je fasse ou je dise, je ne saurai point la remercier comme il soit, ma source de force

A mon frère Oussama et ma sœur Chourouk à qui je souhaite plus de succès et de bonheur, merci pour votre présence et votre soutien.

Ma chère binôme et amie Mounia, qui a partagé avec moi tous les moments d'émotions lors de la réalisation de ce travail.

Bouabi Radjaa

Sommaire

Titre

- Résumé	01
- Remerciement	
- Dédicaces	
- Liste des figures	
- Liste des tableaux	
- Introduction	
01	
- Synthèse bibliographique	
● Chapitre I : Historique et évolution du vaccin antirabique	01
1.1. Historique	02
1.2. Vaccin de première génération	02
1.3. Modifications chimiques du vaccin	03
1.4. Vaccin dépourvu de myéline	03
1.5. Vaccin embryonnaire	04
1.5.1. Embryons à poulet	04
1.5.2. Embryons de canard	04
● Chapitre II : Processus de fabrication d'un vaccin	05
2.1. Fabrication biologique	05
2.1.1. Constitution d'une banque de germes	06
2.1.2. Mise en culture et l'amplification	06
2.1.3 Récolte de l'antigène	06
2.1.4. Concentration et la purification	06
2.1.5. Inactivation	07
2.1.6. Assemblage des valences	07
2.2. Production pharmaceutique	07
2.2.1. Formulation et remplissage	07
2.2.2. Lyophilisation	08
2.2.3. Stabilité de l'antigène	08
2.3. Contrôle	08
2.3.1. Contrôle au cours de fabrication	08
2.3.2. Contrôle des lots	08

2.3.2.1. Stérilité	08
2.3.2.2. Stabilité	08
2.3.2.3. Innocuité	08
2.3.2.4. Agents de conservation	09
2.3.2.5. Durée de l'immunité	09
2.3.2.6. Activité	09
2.3.3. Contrôle des produits finis	09
● Chapitre III : Types des vaccins antirabiques	10
3.1. Vaccins vivants	10
3.1.1. Isolats peu virulents	10
3.1.2. Atténuation par passage	10
3.1.3. Modifications génétiques	10
3.2. Vaccins inactivés	10
3.2.1. Cultures inactivées	10
3.2.2. Toxines inactivés	10
3.2.3. Sous unités	10
3.3. Vaccins dérivés des biotechnologies	10
3.3.1. Catégorie I	10
3.3.2. Catégorie II	11
3.3.3. Catégorie III	11
3.4. Le vaccin antirabique	11
● Chapitre IV : Purification et concentration du vaccin	11
4.1. Ultracentrifugation	13
4.2. Filtration tangentielle	13
4.3. Précipitation au polyéthylène glycol	13
4.4. Chromatographie d'exclusion de taille	14
4.5. Ultrafiltration	15
4.6. Chromatographie d'échange d'ions	16
- Partie expérimentale	17
1- Objectif	17
2- Matériels et méthodes	17
3- Résultats et discussion	26
- Conclusion	33

Liste des figures

	Titre	Pages
Figure 01 :	Louis Pasteur innovant le vaccin de la rage	01
Figure 02 :	Etape de fabrication d'un vaccin	05
Figure 03 :	Ultracentrifugeuse	13
Figure 04 :	Filtre tangentiel utilise pour filtration	14
Figure 05 :	Filtre tangentiel	14
Figure 06 :	Appareil de la chromatographie sèche Le pompage de l'éluant dans la colonne de droite est contrôlé par l'ordinateur	15
Figure 07 :	Cellule BSR cultivé en flacon de culture cellulaire (A avant l'incubation et B après l'incubation)	17
Figure 08 :	Variation de la couleur du milieu DMEM suite à l'ajustassions du pH	20
Figure 09 :	Filtration du milieu préparé	20
Figure 10 :	Flasque de culture cellulaire des BSR	21
Figure 11 :	Observation au microscope optique	22
Figure 12 :	Trypsination des cellules BSR	23
Figure 13 :	Décollement du tapis cellulaire	23
Figure 14 :	La souche LPS du virus rabique décongelé	23
Figure 15 :	Schéma explicatif des quatre dilutions de la souche LPS.	24
Figure 16 :	Infection des cellules BSR à une concentration virale LPS 10^{-2} et 10^{-3}	25
Figure 17 :	Réalisation d'une centrifugation	25
Figure 18 :	Réalisation des dilutions pour titrage	26
Figure 19 :	Plaqué à récipients (puits) pour culture cellulaire	26
Figure 20 :	Cellules BSR sous microscope inversé gr×20	27
Figure 21 :	Observation au microscope du tapis cellulaire des Vero	27
Figure 22 :	Récupération du milieu de culture infecté par le virus LPS	28
Figure 23 :	Observation des champs de pénétration du virus au microscope à fluorescence	32

Liste des tableaux

	Titre	Pages
Tableau 01 :	Composition biochimique du milieu MEM utilisé	29
Tableau 02 :	Composition biochimique du milieu MEM recommandé	29
Tableau 03 :	Résultat de titrage par la technique d'immunofluorescence.	31
Tableau 04 :	Résultat de calcul du titrage des quatre dilutions.	32

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

ARN: acide ribonucléique

BHK21: Baby Hamster Kidney (rein du bébé Hamster)

DMEM : Dulbecco's modified eagle Médium (milieu de eagle modifiée par Dulbecco)

HDCV : Human Diploid Cell Vaccine (Vaccin à base de cellules diploïdes humaines)

HEP : High Egg passage (Haut passage d'œuf)

IEX : chromatographie par échange d'ions (Ion Ex-change Chromatography)

IPA : Institut Pasteur d'Algérie

LEP : Low Egg passage (Faible passage d'œufs)

LPS : louis pasteur Saigon

MEM : Minimum Essentiel Medium (Le milieu essentiel minimum)

NIH: National Institutes of Health

PCECV : Purified Chick Embryo Cell Vaccine (Vaccin à base de cellules d'embryon de poulet purifiées)

PEG : Polymère de l'Ethylène Glycol

pH : Potentiel Hydrogène.

RABV : virus de la rage (Rabies Virus)

SAD : Street Alabama Dufferin

SEC : Size Exclusion Chromatography (chromatographie par exclusion de taille)

SVF : Sérum du veau foetal

TFF : Filtration tangentielle (Tangential Flow Filtration)

VERO : Verda Reno (Rein vert).

PBS : Phosphate-Buffered Saline (Tampon phosphate salin au phosphate)

PDEV:

Introduction

La rage est une maladie virale grave causée par le virus de la rage, un virus à ARN de la famille des *Rhabdoviridae* et du genre *Lyssavirus*. Cette maladie affecte le système nerveux central des mammifères, y compris les humains. La transmission se fait généralement par la salive d'un animal infecté, souvent par une morsure ou une griffure.

Elle tue près de 59 000 personnes par an en Asie et en Afrique. (OMSA, 2024)

La vaccination est la stratégie la plus efficace et la plus rentable pour éviter la rage chez l'animal et l'homme. 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.

L'objectif de notre travail était de suivre les différentes étapes de production d'un vaccin antirabique sur culture cellulaire afin d'éviter les épidémies, de réduire les coûts de santé et pour protéger les générations futures contre les maladies infectieuses.

Cette étude réalisée au sein du laboratoire de production et de Développement des Vaccins Viraux Humains de l'Institut Pasteur (annexe Kouba Alger), a pour but de connaître les différentes étapes de fabrication du vaccin.

- **Chapitre I : Historique et évolution du vaccin antirabique**

1.1 Historique :

Remontant à 40000 ans, la rage se classe parmi les maladies les plus anciennes connues de l'histoire. Dans le passé, les gens avaient peur de la rage après avoir été mordus par un animal potentiellement enragé. Malheureusement, malgré la gravité de cette zoonose infectieuse, les recherches scientifiques n'ont pas réussi à mettre au point un vaccin ou une thérapie avant le XIXe siècle, précisément en 1885 (Fu, 1997) (Koury et Warrington, 2022)

Le développement d'un vaccin antirabique a pris son début bien avant le vaccin de Pasteur. En 1804, Georg Gottfried Zink prouva que la salive d'un animal enragé pouvait causer une infection. En 1852, Apollinaire Bouchardat, un pharmacien français, fut le premier à penser aux inoculations contre la rage. En 1881, l'idée a été réalisée, le vétérinaire français Pierre-Victor Galtier réussit la première immunisation expérimentale chez des moutons en injectant le virus par voie intraveineuse (Natesan, et al. 2023)

En 1885, Louis Pasteur a marqué le début de la vaccination contre la rage comme une mesure d'urgence avant même l'identification de la maladie, initiant ainsi le développement du vaccin antirabique.

1.2 Vaccins de première génération : Vaccin Pasteur (Vaccin à base de tissu nerveux) :

Le premier vaccin humain contre la rage a été développé par Louis Pasteur, et la première vaccination a été administrée à un jeune garçon le 6 juillet 1885, qui avait été sévèrement mordu par un chien enragé. Sa mort était inévitable sans cette intervention.

L'expérience de Pasteur et de ses collègues consistait à fournir une quantité suffisante et stable du virus de la rage comme matériel biologique. Pour cela, il a prélevé de petits fragments de moelle épinière d'un chien enragé et les a inoculés dans la dure-mère du crâne d'un lapin, Vingt-quatre passages de lapin à lapin ont été effectués. Ensuite, il a prélevé des morceaux de moelle épinière et les a exposés à l'air sec, ce qui, grâce à des fragments de potassium placés au fond du récipient, diminuait progressivement la virulence jusqu'à ce qu'elle disparaisse complètement (Mammette, 2002)

Ensuite, Pasteur inocula environ 50 chiens avec la suspension produite à partir de moelle épinière déshydratée. Il observa que les chiens étaient devenus résistants à l'inoculation avec du matériel spinal rabique virulent. (Rappuoli, 2014)

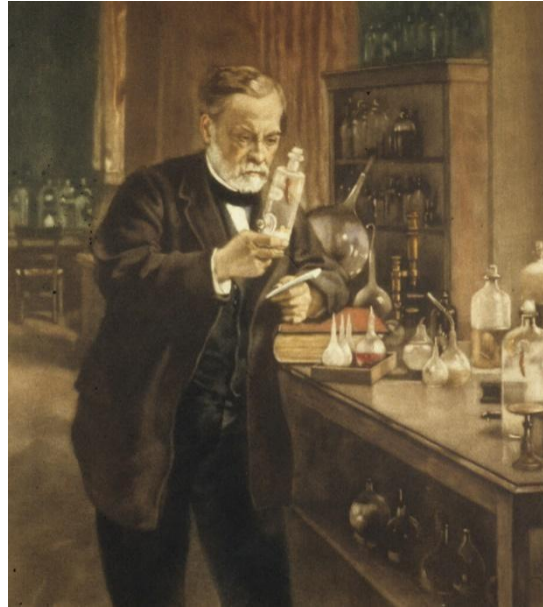


Figure 01 : Louis Pasteur innovant le vaccin de la rage (Gregory Tobias, 1885)

1.3 Modification chimique du vaccin :

Il s'agit d'un passage de l'ancien vaccin pasteurien décrits atténué à un vaccin inactivé. La méthode de Sir David Semple consistait à inactiver le virus rabique en utilisant le phénol ou acide phénique, un antiseptique utilisé pour le traitement des eaux usées. Il suggérait alors qu'il pouvait être utilisé pour tuer les germes avant qu'ils ne s'installent dans le corps ou dans la plaie. Le vaccin de David Semple était à base de tissu nerveux, provenant de moutons adultes.

Semple commença par introduire le vaccin de la rage dans le cerveau de moutons adultes, et il poursuivait par une inactivation phénolique (Chakrabarti, 2010)

À cause de nombreux inconvénients, et effets secondaires graves comme le syndrome de Guillain-Barré, ainsi que le risque de transmission d'encéphalopathies spongiformes transmissibles en raison de la présence de myéline, l'organisation mondial de la santé a recommandé de mettre fin à son utilisation. (Tarantola, 2018)

1.4 Vaccin dépourvu de myéline :

Suite aux effets indésirables du vaccin précédent, il était nécessaire de développer un vaccin moins réactogène. (Svet-Moldavskij et al, 1965)

En raison de l'absence de myéline dans les tissus nerveux embryonnaires et nouveau-nés d'animaux. Cela a conduit au développement d'un vaccin antirabique inactivé dépourvu de myéline, dérivé du cerveau d'une souris allaitante, en utilisant une méthode

D'inactivation phénolique suivie d'une purification partielle. Cependant, selon la recommandation de l'OMS, de nombreux pays ont décidé d'arrêter d'utiliser ce vaccin après de nombreuses années, car la recherche a montré que le vaccin n'était pas complètement exempt de myéline (Vijayakumar et Jose, 2021)

1.5 Vaccins embryonnaires :

La technique de culture d'embryons de poulet ou de canard purifiés est une approche économique et pratique pour la multiplication de divers virus animaux. Celle-ci est due à la facilité d'obtention, la présence d'un environnement naturellement stérile à l'intérieur des composants de l'œuf, et l'incapacité de l'embryon à produire des anticorps contre les virus utilisés comme inocula (Leach et Johnson, 1940)

1.5.1 Embryon de poulet :

À partir des années 1940, des œufs embryonnés de poulet ont été utilisés pour développer des vaccins contre la rage. La souche Flury du virus de la rage a d'abord été appliquée à des poussins, puis établie dans des embryons de poulet, donnant lieu à un vaccin à faible passage d'œuf : ce vaccin a subi 40 à 50 passages ensuite lyophilisé à partir d'une suspension entière d'embryons à 33%. Est utilisé pour vacciner massivement les chiens malgré une virulence résiduelle.

Un autre vaccin a été développé différent du précédent ; il s'agit d'un vaccin à haut passage d'œufs de près de 180 passages sur œufs ou plus, mais a été abandonné dans les années 1960 en raison de son efficacité limitée. (Koprowski et Cox, 1948)

1.5.2 Embryon de canard :

Le processus de production du vaccin purifié à base d'embryons de canard (PDEV) implique l'inoculation de la souche Pitman-Moore du virus de la rage dans des œufs embryonnés de canard. Le RABV est ensuite extrait des cerveaux d'embryons infectés de manière à éviter la libération d'antigènes aviaires solubles, potentiellement problématiques pour la purification

L'utilisation de ces vaccins a été suspendue dans de nombreuses régions du monde car il n'était pas certain de leur efficacité, de leur sécurité et de leur immunogénicité. (Wu et al, 2011)

Chapitre II : Processus de fabrication d'un vaccin

La fabrication des vaccins est un processus plus long et complexe que celui des autres médicaments, principalement en raison des caractéristiques uniques des matières premières utilisées. Ces substances biologiques et microorganismes vivants nécessitent de nombreux contrôles pour garantir la sécurité et la qualité du produit final.

Deux grandes étapes de fabrication sont à distinguer : la fabrication biologique et la fabrication pharmaceutique (Sureau, 1985).

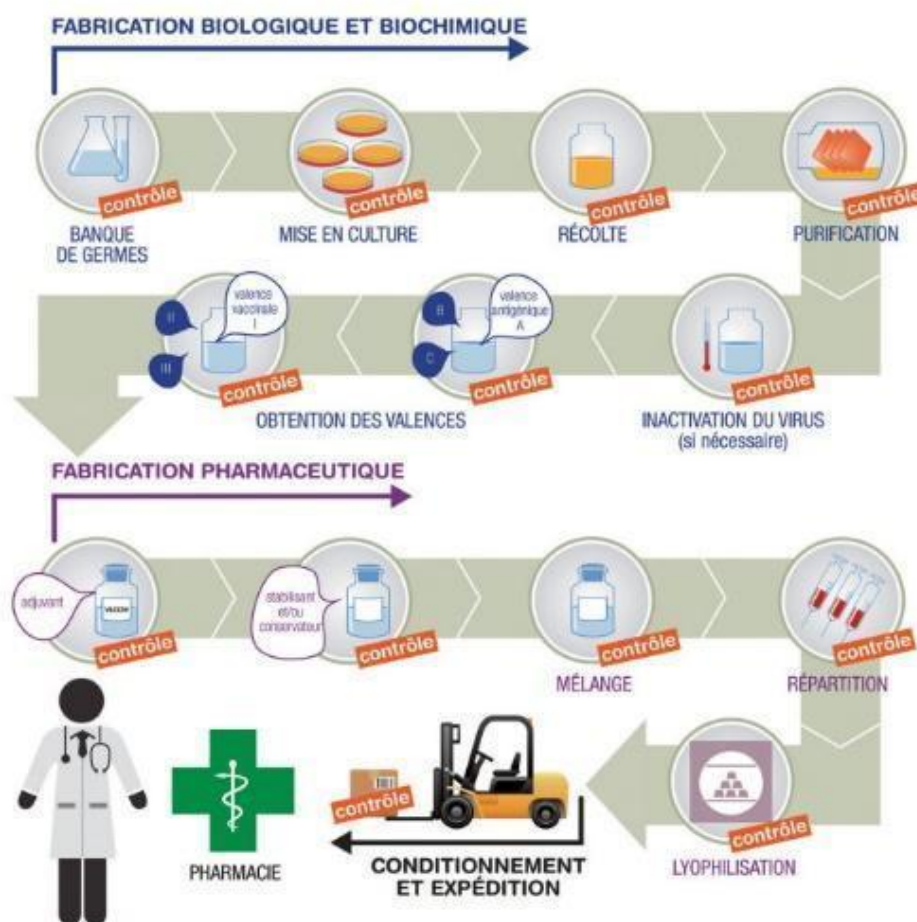


Figure 02 : Etapes de la fabrication d'un vaccin. (Blin, 2021)

1.1 Fabrication biologique :

La fabrication biologique commence par l'utilisation d'une banque de germes (bactéries, virus, levures) et inclut plusieurs étapes : la culture, la récolte, la concentration, la purification de l'antigène et son inactivation. Ce processus permet d'obtenir un antigène

concentré et purifié, qui servira ensuite à produire la valence antigénique (Bouifergane, 2015).

1.1.1 Constitution d'une banque de germes :

C'est le point de départ du processus. Cette banque regroupe principalement des bactéries et des virus, à partir desquels les Antigènes seront développés. Les germes doivent être bien caractérisés et ne pas présenter de mutation.

1.1.2 La mise en culture et l'amplification :

Elles sont spécifiques selon qu'il s'agisse de bactéries ou de virus :

1.1 dans le cas des bactéries, il est nécessaire de maîtriser les paramètres de culture (temps, température, aération, concentration, pression, etc.)

1.2 dans celui des virus, ce sont des cellules animales infectées qui doivent être mises en culture. (Blin, 2021)

1.1.3 La récolte de l'antigène :

Deux techniques de recueil de l'antigène sont utilisées selon la phase de culture : soit les cellules sont récoltées et le milieu éliminé par centrifugation aseptique pour les antigènes microbiens, soit le milieu de culture est récolté et les cellules éliminées par centrifugation ou filtration aseptique pour les antigènes solubles. Les cellules peuvent être conservées en bioréacteur pour certains antigènes solubles ou virus non cytopathogènes, permettant plusieurs récoltes.

1.1.4 La concentration et la purification :

L'objectif principal de la concentration de l'antigène est de diminuer les volumes à traiter pendant les différentes étapes de purification et de débiter la purification de la fraction antigénique.

On peut réaliser cette concentration par fractionnement avec des sels ou des solvants (comme le sulfate d'ammonium ou les sels de calcium, l'éthanol ou le polyéthylène glycol, par exemple pour les anatoxines et les polysaccharides), et/ou par ultrafiltration à l'aide de membranes filtrantes avec des porosités moléculaires spécifiques (de 10 000, 50 000, 100 000 ou 300 000 daltons). (Shi et al, 2004)

La purification consiste à séparer l'antigène des autres composants de l'extrait brut, tels que les protéines, les endotoxines et les acides nucléiques. L'antigène est obtenu grâce à des propriétés physico-chimiques spécifiques des molécules d'antigène, telles que la taille, la charge, la densité, l'hydrophilie et la solubilité. Le degré de purification affecte la

tolérance, l'immunogénicité et l'efficacité du produit. Les vaccins inactivés ont un rendement plus faible en raison des étapes de purification abruptes et des doses plus élevées.

Les vaccins expérimentaux produisent de meilleurs rendements, mais des contrôles stricts sont nécessaires (Soubeyrand, 2018).

1.1.5 Inactivation :

La technique d'inactivation implique de restreindre totalement l'activité d'une souche (multiplication, mobilité, production de toxines...). La majorité des méthodes se basent sur l'établissement de liaisons supplémentaires entre et à l'intérieur des protéines, ce qui entrave leur activité. La plupart du temps, l'inactivation est effectuée en utilisant un protocole standardisé de chauffage de la culture en présence d'agents oxydants tels que le formaldéhyde ou la bêta propiolactone (Bouifergane ,2015).

1.1.6 Assemblage des valences :

Il correspond au nombre de souches microbiennes présentes dans un même vaccin (appelé vaccin combiné), les Ag sont rassemblés en un seul composant (Blin, 2021)

1.2 Production pharmaceutique :

La fabrication pharmaceutique implique la production de la valence antigénique à partir d'un antigène concentré et purifié, en y ajoutant des stabilisants, des conservateurs et des adjuvants. Le produit final obtenu est ensuite réparti dans des seringues ou des flacons, puis conditionné dans son emballage final (Katdare et Chaubal 2006) .

1.2.1 Formulation et remplissage :

La formulation implique de mélanger de manière homogène tous les éléments qui composeront le vaccin final dans un seul récipient. La fabrication des vaccins implique généralement l'utilisation d'un liquide de mise en suspension (eau stérile, solution saline ou liquides contenant des protéines) ; des excipients : conservateurs et stabilisants (comme l'albumine, les phénols ou la glycine) ; et des adjuvants ou amplificateurs qui augmentent l'efficacité du vaccin.

Le processus de remplissage exige l'adhésion stricte à des procédures valables et du personnel hautement qualifié (Soubeyrand, 2018)

1.2.1 Lyophilisation

La lyophilisation a été un progrès décisif dans la stabilisation des vaccins, permettant une conservation à 37°C pendant plusieurs mois, notamment dans le contexte du programme d'éradication de la variole. Ce processus consiste en la déshydratation d'une solution gelée sous vide, préservant ainsi la structure moléculaire des antigènes et des germes. Certains antigènes fragiles, comme ceux des vaccins vivants atténués, nécessitent d'être congelés ou plus souvent lyophilisés pour une conservation optimale

1.2.2 Stabilité de l'antigène

Les antigènes microbiens sont souvent instables en solution, perdant progressivement leur potentiel immunogène avec le temps et les variations de conditions de conservation. Pour pallier cela, l'addition de glycérol à la vaccine et son conditionnement en tube capillaire, permettant un transport plus sûr. Diverses mesures, comme le maintien à basse température et l'ajout de stabilisants, sont utilisées pour améliorer la stabilité des vaccins.

Le maintien d'une température basse, entre +2 ° C et +8 ° C, est requis pour tous les vaccins pour le stockage des en-cours de fabrication. D'autres mesures sont prises, en fonction de la nature de l'antigène : addition de formules ioniques stabilisantes, congélation, lyophilisation et obscurité (Blin, 2021)

1.2.3 Contrôles

2.2.3 Contrôle au cours de la fabrication :

Il s'agit de surveiller la croissance du virus pour obtenir un titre optimal et garantir l'absence de contamination microbienne. Pour les vaccins à virus vivants, la cinétique de multiplication doit être établie pour atteindre un titre viral final correspondant à la protection souhaitée. Pour les vaccins à virus inactivés, les propriétés immunogènes du produit final sont évaluées par des tests in vitro (ELISA, immunodiffusion en gel, épreuve de liaison des anticorps, ou coloration des cellules infectées), ce qui permet de déterminer le meilleur moment pour récolter le virus sur les cultures cellulaires.

2.2.4 Contrôle des lots :

2.2.4.1. Stérilité :

Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques.

2.2.4.2. Stabilité : La durée de conservation suggérée doit être confirmée par des tests appropriés. Ces essais incluent des tests de stabilité biologique et physico-chimique, qui

doivent être réalisés sur un nombre suffisant de lots de vaccins stockés dans les conditions recommandées. Les vaccins à virus vivant sous forme liquide ont généralement une faible thermo stabilité. En revanche, les vaccins à virus inactivés lyophilisés sont généralement stables pendant 2 ans à 4°C.

2.2.4.3 Innocuité : Les tests d'innocuité des lots de vaccins à virus inactivé sont réalisés par inoculation sur des cultures cellulaires ou des souris par voie intracérébrale afin de détecter la présence de virus viables. Pour les vaccins à virus vivant, un test d'innocuité doit être effectué sur chaque lot en utilisant l'espèce cible. Au moins 3, et de préférence 5 à 6 animaux de l'espèce cible, reçoivent une dose équivalente à 10 fois la dose recommandée, administrée par la voie classique. Les animaux sont observés pendant 90 jours pour détecter toute réaction secondaire.

2.2.4.4 Agents de conservation : Les vaccins à virus inactivé contiennent des agents de conservation tels que le formol et le merthiolate. La nature et la quantité de ces agents doivent être conformes aux exigences des réglementations nationales.

2.2.4.5 Durée de l'immunité

La durée de l'immunité doit être établie pour l'agrément du vaccin sur les espèces cibles avec un protocole de vaccination défini. Après quoi, le test n'est plus réalisé pour chaque lot

2.2.4.6 Activité : La quantité de virus présente dans les vaccins vivants atténués et les vaccins recombinants est déterminée par titrage. Une fois que la corrélation entre l'activité du vaccin sur l'espèce cible et le titre viral est établie, le titrage viral devient un indicateur fiable de l'efficacité du vaccin. Ce titrage est effectué sur des cultures cellulaires ou par inoculation intracérébrale chez des nouveau-nés (chez la souris, cela n'est possible que pour quelques virus atténués).

Les vaccins recombinants doivent être testés pour l'expression de la protéine rabique jusqu'à ce que la stabilité de cette expression soit assurée tout au long du processus de fabrication. Le titre du vecteur devient alors un indicateur fiable de l'efficacité du vaccin (Fournier et al, 2003).

Pour les vaccins à virus inactivés, la corrélation entre l'efficacité pour l'espèce cible et la valeur antigénique déterminée chez la souris est un indicateur fiable de l'efficacité du vaccin. Aux États-Unis, l'efficacité du vaccin est établie par le test des NIH (National Institutes of Health), tandis qu'ailleurs, le test de la Pharmacopée Européenne est largement adopté. (l'OIE ,2005).

2.2.5 Contrôles du produit fini : deux types de contrôle sont proposé ; innocuité, activité

Chapitre III : Types de vaccin antirabique

Différents types de vaccin existent :

1.1 Vaccins Vivants

1.1.1.1 Isolats peu virulents :

Ces vaccins sont issus d'isolats naturellement peu virulents d'agents pathogènes, administrés dans des conditions spécifiques pour immuniser sans transmettre la maladie

1.1.1.2 Atténuation par passage :

Certains vaccins sont fabriqués en atténuant des isolats virulents par des passages successifs sur des animaux de laboratoire, des milieux de culture, des cultures cellulaires ou des œufs embryonnés pour sélectionner des variants moins virulents.

1.1.1.3 Modification génétique :

Les vaccins vivants peuvent également être produits en supprimant des gènes de virulence ou en insérant des gènes immunogènes spécifiques dans un vecteur avirulent (Canouï et Launay, 2019)

1.2 Vaccins Inactivés

1.1.2 Cultures inactivées :

Ces vaccins peuvent contenir des cultures de micro-organismes qui ont été inactivés par un agent chimique ou par un procédé physique.

1.1.3 Toxines inactivées :

Ils peuvent également contenir des toxines inactivées.

1.1.4 Sous-unités :

Ces vaccins incluent des sous-unités (fractions antigéniques de micro-organismes) extraites de cultures ou produites en utilisant des techniques d'ADN recombinant (Métianu et *al*, 1981)

1.2 Vaccins dérivés des biotechnologies

1.2.1 Catégorie I : Produits tués ou non viables

Les produits incluent des micro-organismes inactivés, qu'ils soient entiers ou sous-unitaires, produits en utilisant les méthodes de l'ADN recombinant ne représentant qu'un risque minime pour l'environnement et ne présentant aucun nouveau danger significatif en termes de biosécurité.

1.2.2 Catégorie II : Micro-organismes vivants modifiés

La catégorie II concerne les produits contenant des micro-organismes vivants modifiés par l'ajout ou la suppression de gènes. Les gènes ajoutés peuvent coder pour des marqueurs antigéniques, des enzymes ou d'autres substances biochimiques, tandis que les gènes supprimés peuvent être liés à la virulence, à l'oncogénicité ou à d'autres caractéristiques biochimiques. Les modifications génétiques ne doivent pas augmenter la virulence, la pathogénicité ou la capacité de survie par rapport à l'état sauvage, tout en préservant les caractéristiques de sécurité du micro-organisme

1.2.3 Catégorie III : Utilisation de vecteurs vivants

La catégorie III regroupe des produits utilisant des vecteurs vivants pour transporter des gènes recombinés codant pour des immunogènes efficaces chez l'espèce cible. Les vaccins à ADN plasmidique, une innovation récente, exploitent cette technologie pour induire une immunité ciblée et efficace. (OIE, 2022)

1.3 Le vaccin antirabique :

- **Les vaccins fabriqués à partir de la souche Flury**

En 1939, une souche de la jeune Miss Flury, contaminée par un chien, a été isolée et adaptée à l'œuf embryonné. Elle a été proposée comme virus-vaccin après 50 passages sous le nom de Flury Low Egg Passage (L.E.P.), puis après 130 passages supplémentaires sous le nom de Flury High Egg Passage (H.E.P.). Dans de nombreux pays, cette souche est actuellement employée comme vaccin à virus modifié après avoir été réalisée soit *in ovo*, soit sur culture cellulaire (Coulanges et *al*, 1974)

- **Les vaccins fabriqués avec la souche S.A.D.**

En 1935, cette souche a été découverte à partir d'un chien décédé de rage des rues en Alabama (d'où son nom de Street Alabama Dufferin) et a été testée sur des souris, des cellules de rein de hamster, des œufs embryonnés et des cellules de rein de porc.

Elle est actuellement employée comme vaccin après culture sur des cellules de reins d'hamster, de chien, de bovin ou de porc (Baer, 1985)

- **Vaccin La souche Wistar du virus rabique :**

C'est un vaccin antirabique préparé sur cellules Vero à base de la souche Wistar de virus rabique, Les expériences sur les cellules Vero avec le vaccin purifié révèlent des réactions en anticorps neutralisants après la primovaccination et le rappel tout à fait similaires à celles observées après l'utilisation des vaccins préparés sur les cellules diploïdes humaines. En Thaïlande, la combinaison du vaccin purifié préparé sur cellules Vero et des immunoglobulines antirabiques a été efficace après exposition.

Les vaccins antirabiques préparés à partir de la souche originale de Pasteur en 1985 et des souches dérivés (Pasteur Virus, Challenge Virus Standard, Pitman-Moore, etc.), et les souches isolées plus récemment (Flury, Street-Alabama-Dufferin [SAD], Vnukovo and Kelev) protègent contre toutes les souches de géotypes 1 isolées jusqu'ici.

Les vaccins antirabiques classiques peuvent ne pas garantir une protection croisée adéquate contre les autres lyssavirus ; aucune protection n'est offerte contre le virus Mokola.

La préparation des vaccins antirabiques inactivés suit les mêmes principes que chez l'homme ou chez l'animal, même si des adjuvants peuvent être ajoutés aux vaccins vétérinaires. Les vaccins vivants sont également efficaces par voie orale chez l'animal et peuvent être administrés sous forme d'appâts pour l'immunisation des animaux sauvages (ou domestiques). (OIE, 2005).

- **Vaccin anti rabique produits en Algérie :**

Deux types de vaccins antirabiques sont produits en Algérie :

1. Vaccins Antirabique tissulaire lyophilisé préparé à partir de cerveaux de souriceaux nouveau-nés
2. Antirabique cellulaire vivant lyophilisé préparé à partir des cellules BHK 21 ou cellules VERO (Institut Pasteur Algérie, 2023).

- Chapitre IV : Purification et concentration du vaccin

Au fil des dernières décennies, divers procédés de concentration et de purification de l'antigène du virus rabique ont été mis au point, mais seuls l'ultrafiltration et la centrifugation se sont révélés efficaces pour sa production à grande échelle (Barth et al,1982)

1.Ultracentrifugation différentielle :

Cette méthode utilise des ultracentrifugeuses capables de générer des forces centrifuges extrêmement élevées pour séparer les particules virales des autres composants de la solution.

Elle permet de concentrer les virus à partir de grands volumes de cultures cellulaires ou de liquides biologiques de manière efficace. L'échantillon est soumis à plusieurs cycles de centrifugation, ce qui conduit à la formation d'un culot sédimentaire. Après chaque cycle, le culot est retiré et la force centrifuge est augmentée. (Anonyme, 2024).



Figure 03 : Ultracentrifugeuse

(Anonyme, 2011)

2. Filtration tangentielle :(microfiltration)

La Filtration tangentielle utilise des membranes poreuses pour séparer les virus des plus petites (comme les ions et les petites protéines) tout en permettant le passage du solvant (généralement de l'eau ou d'un tampon).

C'est une méthode douce permettant de concentrer les virus sans endommager leur structure. Le liquide à filtrer circule parallèlement à une membrane poreuse. Sous l'effet d'un gradient de pression, le liquide traverse la membrane et se clarifie. Le flux tangentiel génère des turbulences et des contraintes de cisaillement, limitant ainsi l'accumulation de particules sur la surface de la membrane et retardant son colmatage. Malgré cela, un encrassement progressif des membranes se produit. Pour minimiser ce phénomène, des rétro-filtrations doivent être effectuées régulièrement, généralement toutes les 2 à 3 minutes.

Les avantages de la technique : sur l'environnement, la sécurité alimentaire...etc.(SIVA, 2024). (Institut Français De La Vigne Et Du Vin)



Figure 04 : Filtre tangential pour filtration

(Olivier Lemoine, 2015)



Figure05 : Filtre tangential

(Anonyme, 2015)

3. Précipitation au polyéthylène glycol (PEG) :

Le PEG est ajouté à une solution virale pour provoquer la précipitation des particules virales, qui peuvent ensuite être récupérées par centrifugation.

Cette méthode est couramment utilisée pour concentrer les virus à partir de grandes quantités de liquide, tout en éliminant une grande partie de la partie des contaminants. Les PEG, des polymères hydrophiles non ioniques, se lient aux molécules d'eau en solution. À des concentrations très élevées, ils déplacent l'eau de la couche de solvatation qui entoure les protéines. (Anonyme, 2023).

4. Chromatographie d'exclusion de taille (SEC) :

Cette méthode utilise des colonnes remplies de matériaux poreux qui permettent aux molécules plus petites de pénétrer dans le matériau de remplissage, tandis que les particules virales plus grandes passent plus rapidement à travers la colonne

La chromatographie d'exclusion de taille (SEC) est utilisée pour concentrer les virus en éliminant les petites molécules et les agrégats, ce qui améliore la pureté du produit final. Cette méthode, également connue sous le nom de tamisage moléculaire ou filtration sur gel, sépare les molécules en fonction de leur masse moléculaire, bien que la forme des molécules joue également un rôle. La séparation des constituants se fait selon leur rayon de Stokes ou rayon hydrodynamique (R_s),

Le principe consiste à faire migrer l'échantillon à analyser au milieu de billes poreuses. Les molécules suffisamment petites pour pénétrer dans les pores des billes seront ralenties dans leur progression, tandis que les molécules trop grandes pour entrer dans les billes progresseront plus rapidement en passant entre les billes. (Anonyme, 2023).

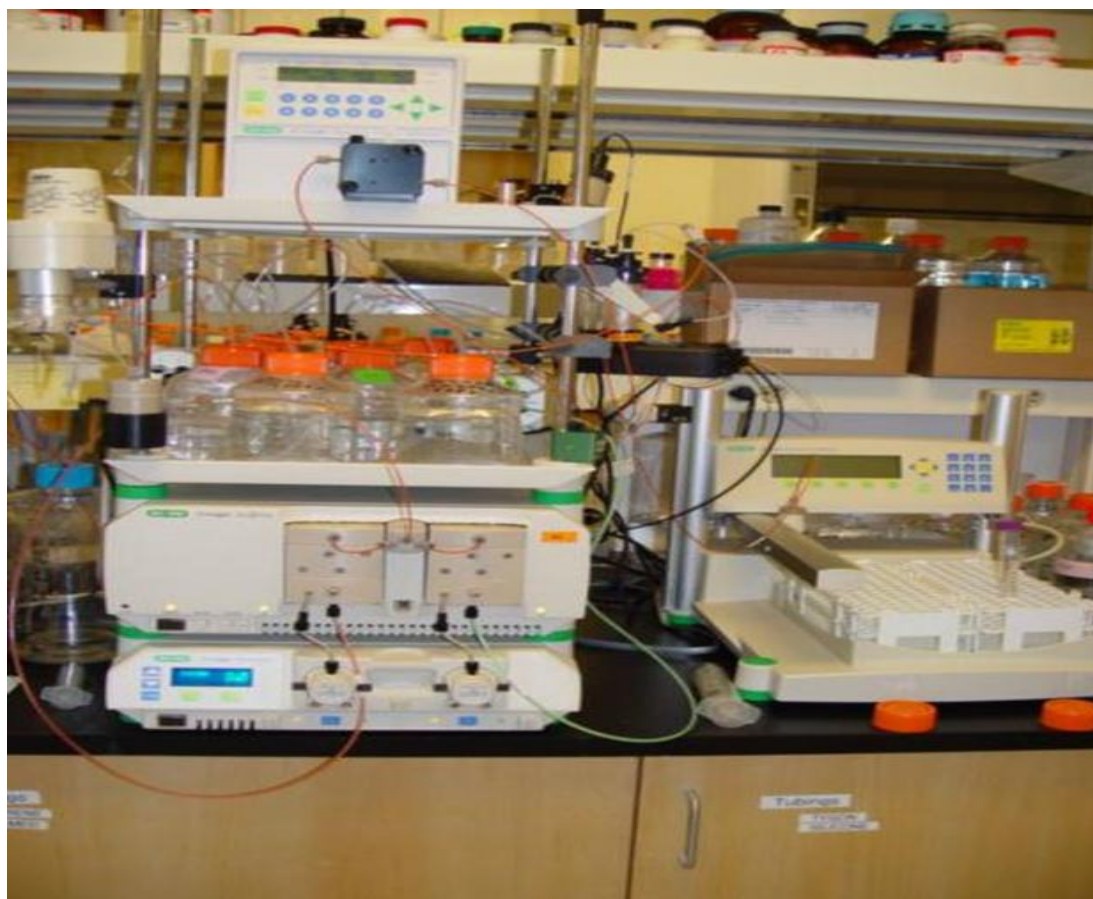


Figure 06 : Appareil de la chromatographie sèche. Le pompage de l'éluant dans la colonne de droite est contrôlé par l'ordinateur. (Techno-science, 2023).

5. Ultrafiltration :

Utilisation de membranes à pores de taille spécifique pour séparer les virus et les particules virales des autres composants de la solution en fonction de leur taille et de leur poids moléculaire.

L'ultrafiltration est une technique de séparation physique utilisant des membranes poreuses (taille des pores entre 100 et 2 nm) pour séparer des éléments dissous comme les virus et les protéines dans un liquide. Le liquide circule tangentiellement à la membrane et, sous l'effet de la pression, une partie traverse la membrane pour être clarifiée. Ce procédé

repose sur une différence de pression pour retenir les solutés plus gros que les pores de la membrane. Le principe est similaire à la microfiltration, la nanofiltration et l'osmose inverse, mais avec des tailles de pores différentes. L'ultrafiltration est utilisée dans divers domaines tels que l'agroalimentaire, le traitement de l'eau et la bio-industrie/pharmacie.

6. Chromatographie par échange d'ions :

La chromatographie par échanges d'ions (IEX) permet de séparer des molécules en fonction de leurs charges de surface. Cette technique offre des séparations de haute résolution et une grande capacité de charge. La séparation repose sur une interaction réversible entre la protéine chargée et une résine de charge opposée. Grâce à la rapidité de la cinétique d'échange des ions, des débits élevés peuvent être utilisés.

L'IEX est recommandée pour obtenir des protéines de grande pureté, quelle que soit la protéine à purifier, qu'il s'agisse d'anticorps, de protéines recombinantes ou de protéine non marquée

L'IEX est fondé sur les interactions électrostatiques entre une molécule chargée et une résine chargée supposément. Résine et protéine doivent être de charges opposées et la protéine doit être totalement chargée. Pour cela, le pH de la solution doit différer du point isoélectrique de la protéine d'au moins 2 unités. Le point isoélectrique de la protéine donnera le pH auquel nous travaillerons pour une absorption totale de la protéine sur le support.

Principe de la méthode : Les molécules sont séparées en fonction de leur charge de surface globale. La séparation dépend du pH et de la force ionique (conductivité) de la phase mobile (éluant).. (Interchim,2020).

Partie expérimentale

1.1 Objectif :

L'objectif de notre travail a été de réaliser un suivi des différentes étapes de production du vaccin antirabique cellulaire en Algérie. Notre travail s'est déroulé à l'Institut Pasteur d'Algérie durant la période du mois d'avril jusqu'à la fin juin 2024.

1.2 Matériel et méthode :

L'expérience de notre travail a été réalisée au niveau de laboratoire de la production de vaccin antirabique à l'annexe Kouba de l'institut Pasteur d'Algérie. Tous les matériels utilisés dans cette étude sont fournis par ce service.

1.2.1 Matériels :

1.2.1.1 Matériels biologique :

Pour la production du vaccin antirabique, il est nécessaire de fournir :

1.2.1.1.1 La lignée cellulaire (BHK 21) :

Les cellules BHK-21 clone 13, une sous-lignée de la lignée cellulaire Baby Hamster Kidney (BHK), sont devenues un modèle essentiel dans la recherche en virologie et en biologie moléculaire en raison de leur robustesse, de leur facilité de culture et de leur grande efficacité de transfection. Elles sont utilisées dans l'étude de l'infection virale, de la production d'antigènes et de la synthèse de protéines recombinantes.

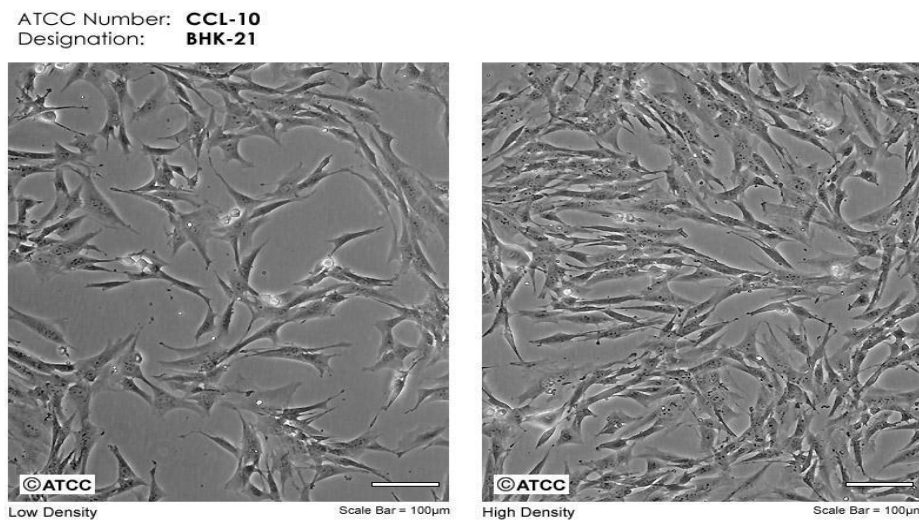


Figure 07 : Cellules BSR cultivées en flacon de culture cellulaire (A avant l'incubation et B après l'incubation)(Anonyme, 2024)

1.2.1.2 La lignée cellulaire des VERO :

Les cellules VERO sont une lignée cellulaire utilisée pour les cultures cellulaires. Cette lignée a été isolée à partir de cellules épithéliales de rein d'un singe vert africain. Elles sont largement utilisées dans le domaine de la virologie, notamment comme cellules hôtes pour la culture de virus (Anonyme, 2023)

1.2.1.3 La souche vaccinale LPS :

La souche utilisée à l'IPA est la souche fixe Louis Pasteur Saïgon LPS du virus rabique. En 1890, Calmette avait envoyé cette souche virale de Paris à Saïgon et l'avait entretenue sur des cerveaux de lapin. À son 3258^e passage, elle a été expédiée de Saïgon à Paris en juillet 1963. Elle passe 5 fois à Paris avant d'être envoyée en Algérie le 4 décembre 1965.

Louis Pasteur Saigon LPS est actuellement en Algérie à son 20ème passage, ce qui représente le 3278ème passage depuis son origine (Kaplan et *al*, 1974)

1.2.1.4 Milieu de culture DMEM : est un milieu de culture utilise pour assurer la croissance des cellules BSR .Il se caractérise par une teneur élevée en glucose, de la L-glutamine, du rouge du phénol et du pyruvate de sodium. Il ne contient en revanche pas de facteurs de croissances, d'où le besoin de le compléter avec d'autres produits tels que le SVF

1.3 Matériel et équipements :

- Poste de sécurité microbiologique (PSM) classe 2 "hôte à flux laminaire "
- Enceintes réfrigérées :- 20 °C (+/- 5°C), - 80 °C (+/-5°C) et + 5 °C (± 3 °C)
- Enceintes thermostatique : à + 37 °C (± 2 °C)
- Microscope inversé et droit
- Petit matériel courant de laboratoire (stérile) : béchers, éprouvettes graduées, tubes de centrifugation avec bouchons, microtubes de 1,5ml, pipettes, barreau magnétique
- Cellule de comptage (Malassez)
- Appareils de purification
- Agitateur magnétique
- Flasque pour culture cellulaire (25cm 2,75cm2 ou/et 150cm2)

1.4 Plan du travail :

- Préparation du milieu de culture
- Préparation de la culture cellulaire
- Décongélation des cellules
- Repiquage de la lignée cellulaire BSR et VERO.
- Observation des cellules sur microscope inversé.
- Trypsination.
- Décongélation de la semence virale LPS.
- Infection de la lignée BSR par la souche LPS
- Récolte
- Titrage

1.5. Méthodes :

1.5.1 Préparation des milieux de culture DMEM :

Le milieu de culture est préparé à partir d'un milieu en poudre dissous dans 5 L d'eau. Nous avons les étapes de préparation suivantes :

- Mesurer 90 % du volume final d'eau permutée dans un flacon contenant un barreau aimanté et placer le flacon sur un 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 le reste de l'eau permutée et mesurer le pH sur une petite quantité de milieu prélevée dans un flacon. Ensuite, ajuster le pH si nécessaire à 7,4 par l'ajout de gouttes d'acide chlorhydrique.
- Incorporer 2 ml de la solution d'antibiotiques-antimycosiques par litre et laisser sur l'agitateur magnétique jusqu'à ce que la dissolution soit complète.
- Le milieu de culture est suivi d'une filtration et d'une stérilisation. Répartir le milieu, selon les besoins, dans des flacons de 100, 250, ou 500 ml et placer les flacons à l'étuve à 37°C pendant au moins 48 heures (contrôle de stérilité). Conserver ensuite les flacons au réfrigérateur à +4°C. Avant utilisation, ramener le milieu à 37°C au bain-marie, puis ajouter le S.V.F.



Figure 08 : Variation de la couleur du milieu DMEM suite à acceptation du pH
(Photo personnelle, 2024)



Figure 09 : Filtration du milieu préparé (photo personnelle, 2024)

1.3.1 Préparation de la culture cellulaire :

1.3.1.1 Décongélation des cellules :

La décongélation, à l'inverse de la congélation, doit être effectuée très rapidement pour respecter la viabilité des cellules.

- Préparer le flacon de milieu de culture cellulaire complet
- Sortir l'ampoule de l'azote liquide
- La placer aussitôt au bain Marie à + 37 °C (± 2 °C) pendant environ une minute, le temps de la décongélation de la suspension cellulaire.

- Nettoyer l'extérieur de l'ampoule à l'alcool à 70°C de façon à minimiser les risques de contamination
- A l'aide d'une pipette, prélever son contenu et le déposer dans la boîte de culture cellulaire
- Incuber la boîte dans une enceinte thermostatique à + 37 °C (± 2 °C)
- Le milieu doit être changé après 24 heures de mise en culture afin d'éliminer l'agent cryoprotecteur qui, à + 37°C, est toxique pour les cultures cellulaires

1.3.1.2 Repiquage de la lignée cellulaire BSR et la ligne cellulaire VERO :

Le repiquage, une étape régulière dans la culture cellulaire in vitro, Une fois que les cellules ont atteint une confluence maximale et que le milieu est épuisé de ses réserves, elles sont transférées dans un nouveau flasque contenant un milieu frais et riche et la densité cellulaire est inférieure à la confluence, ce qui permet aux cellules de se multiplier.



Figure 10 : Flasque de culture cellulaire des BSR (photo personnelle ,2024)

1.3.1.3 Observation des cellules au microscope inversé :

L'observation des cellules se fait sous un microscope inversé à un grossissement de $\times 10$. Cette étape est réalisée pour observer l'état du tapis cellulaire, vérifier la confluence, et la présence de champignons ou de contamination



Figure 11 : Observation au microscope optique (photo personnelle, 2024)

1.3.1.4 Trypsination :

Technique utilisée pour dissocier les cellules adhérentes des surfaces de culture. Elle implique l'utilisation de la trypsine, une enzyme protéolytique qui hydrolyse les protéines d'adhésion reliant les cellules à la matrice extracellulaire et entre elles

Cette technique consiste à :

- Éliminer le milieu de culture contenu dans le flasque.
- Verser 2 ml de trypsine dans le flasque de culture et agiter doucement pendant 30 secs puis jeter le liquide
- ajouter une 2^e fois 2 ml de trypsine dans le flasque et agiter délicatement
- Remarquer une nappe cellulaire transparente qui se forme et le début du décollement de cette nappe sur les bords.
- Jeter le contenu dans un bécher
- Pour arrêter l'action de la trypsine et le décollement du tapis cellulaire ajouter milieu de culture DMEM (la trypsine est arrêtée par le SVF) en utilisant un mouvement mécanique à l'aide d'une pipette pasteur « mouvement de refoulement du milieu »

- Répartir la quantité obtenu sur de flasque est ajouter le milieu de culture jusqu'à 15 ml
- Réaliser une observation au microscope optique pour voir l'état des cellules
- Mettre à un incubateur de 37 degré, 5% CO2 et laisser pendant 48h .

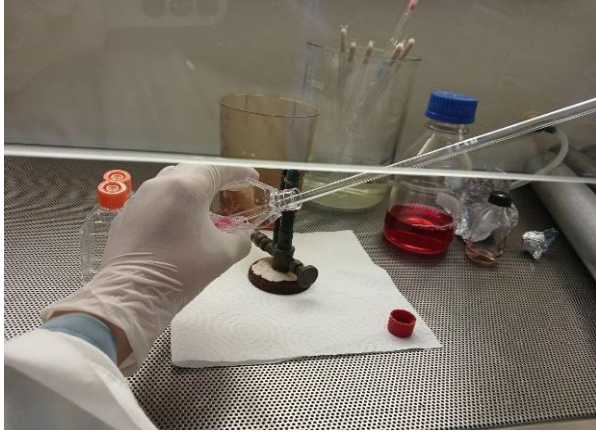


Figure 12 : Trypsination des cellules BSR

(Photo personnelle, 2024)



Figure 13 : Décollement du tapis cellulaire

(Photo personnelle, 2024)

II.3. Décongélation de la semence virale :

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



Figure 14 : La souche LPS du virus rabique décongelé (photo personnelle, 2024)

II.4. Infection In-vitro de la culture cellulaire par le virus rabique souche LPS :

Le but de cette étape est de permettre au virus de se multiplier à l'intérieur des cellules BSR afin de produire une quantité suffisante de la semence virale et connaître le titre de cette dernière.

1. Numération cellulaire
2. Réalisation de 04 dilutions :

- 1^{er} dilution : LPS 1

Dans un flasque de culture cellulaire ajouter 10 ml de la suspension viral

- 2^{em} dilution : LPS 10^{-1}

Ajouter 1 ml de la suspension viral et 9 ml du milieu DMEM + dextran " solution ajouter pour fragiliser la membrane cellulaire et facilite la multiplication viral " dans un flasque de culture cellulaire

- 3^{em} dilution : LPS 10^{-2}

Ajouter 1 ml de la solution précédente 10^{-1} et 9 ml du milieu DMEM + dextran dans un flasque de culture cellulaire BSR.

- 4^{em} dilution : LPS 10^{-3}

Ajouter 1 ml de la solution précédente 10^{-2} et 9 ml du milieu DMEM + dextran dans un flasque de culture cellulaire BSR.

Mettre les 04 flasques dans un incubateur à 37 degrés Celsius et laisser pendant une heure pour la fixation. Ensuite les 04 flasques seront transférer dans un incubateur de 33 degrés Celsius et la récolte est réalisée après 05 jours.



Figure 15 : Infection des cellules BSR à une concentration virale LPS 10^{-2} et 10^{-3}
(Photo personnelle, 2024)

II.5. Récolte

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



Figure 17 : Réalisation d'une centrifugation (photo personnelle, 2024)

II.7. Titrage d'immunofluorescence directe :

Le but de cette technique est de déterminer la concentration d'un virus

La méthode interne du laboratoire consiste à :

Jour de préparation :

- 4 Dilutions du virus ont été obtenues : LPS 1, LPS 10^{-1} , LPS 10^{-2} , LPS 10^{-3} .
- Pour chaque dilution, 04 tubes de 0,9 ml des milieux DMEM ont été préparés
- Pour le Virus LPS 1, mettre 0,1 ml du virus dans un tube de 0,9 ml des milieux
- Préparer des dilutions successives jusqu'à arriver à la dilution 10^{-3} pour chaque dilution du virus.
- La cellule BSR sont déjà préparé, une numération cellulaire est réalisé avec la cellule de Malassez le nombre de cellule est 8×10^6 /ml
- Mettre dans chaque 0,2 ml du virus de chaque dilution
- Mettre 0,2 ml de suspension cellulaire dans chaque couple.
- Incubation pendant 48 h sous CO₂ à 37 °C

Jour de coloration :

- Retirer les lames et rincer délicatement au PBS (Tampon phosphate salin au phosphate)
- Puis une fixation à l'acétone : 5 min dans un premier bain et 10 minutes dans un deuxième
- Sécher les lames.



Figure18 : Réalisation des dilutions pour titrage (photo personnelle, 2024)



Figure 19: Plaque à récipients (puits) pour culture cellulaire (personnelle, 2019)

II.9 Résultats et Discussion :**.9. Observation après repiquage de la lignée cellulaire :**

- **BSR (BHK 21)** : Après la période d'incubation (24-48 h) les boîtes inoculées présentent des modifications significatives de la couche cellulaire. Les cellules dans le flacon ont proliféré, formant ainsi une monocouche cellulaire, uniforme et confluente, c'est le tapis cellulaire.



Figure 20 : Les cellules BSR sous microscope inversé gr×20 (photo personnelle, 2024)

On a effectué plusieurs passage et trypsination afin d'avoir un grand une quantité suffisante de cellule pour réaliser l'infection le résultat de ces passages était toujours positif.

- **VERO** : au premier passage des VERO dans des boites qui contient du Milieu MEM, on observe au microscope une monocouche de cellule de forme arrondies à allongé et la formation d'un tapis cellulaire confluent.

Après le 1^{er} passage des VERO et lors du 2^{em} passage :

Après 4 à 5 jours d'incubation on remarque que les cellules ont poussé, mais leur activité à se multiplier est très ce qui fait que le tapis cellulaire n'a pas atteint la confluence.

Donc on constate un défaut de croissance des VERO qui devront être utilisés pour l'infection.

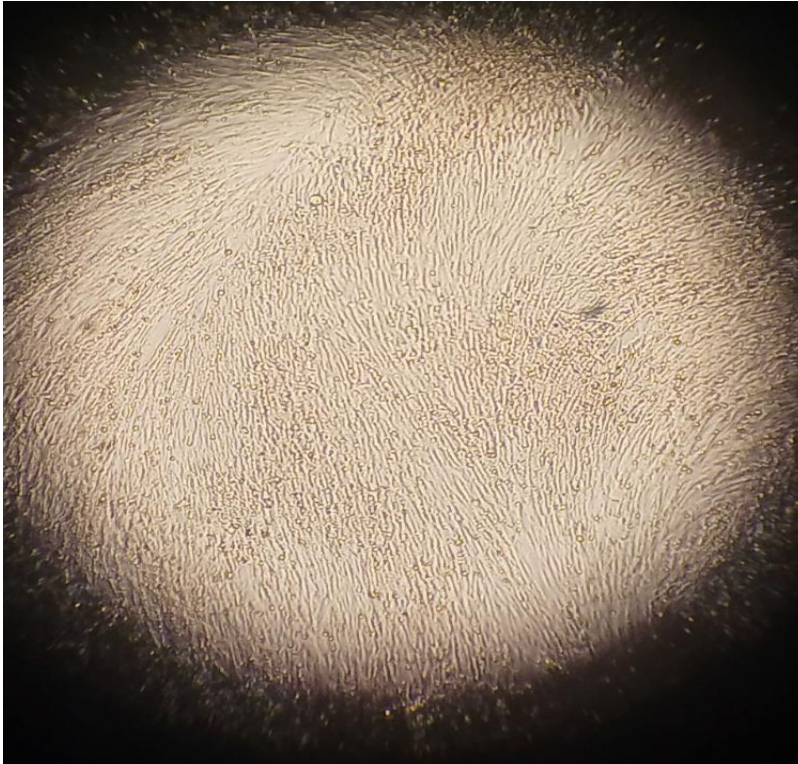


Figure 21: Observation au microscope du tapis cellulaire des VERO
(photo personnelle, 2024)

Celle-ci peut être dû à :

1. Les cellules VERO utilisées dans notre étude ont été transférées de leur milieu de décongélation MEM à un autre milieu MEM à cause de la non disponibilité du milieu précédent, dont les caractères biochimique du nouveau milieu sont différent de celui du milieu de congélation, ce qui peut justifier le ralentissement de croissance au 2em passage et la mort de certaines cellules.
2. Le milieu MEM utilisé pour la culture présente les caractéristiques biochimiques suivantes :

Tableau 01 : Composition biochimique du milieu MEM utilisé

Sel inorganique	Concentration (mg/L)
Chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	185.0
Chlorure de magnésium ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	100.0
Sulfate de Magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	100.0
Chlorure de Potassium (KCl)	400.0
Phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4)	60.0
Bicarbonate de Sodium (NaHCO_3)	350.0
Chlorure de Sodium (NaCl)	8000.0

Tableau 02 : Composition biochimique du milieu MEM recommandé

Le milieu MEM recommandée pour es VERO présente le caractéristique biochimique suivante :

Sels Inorganique	Concentration (mg/L)
Chlorure de Calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	264.0
Sulfate de Magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	200.0
Chlorure de Potassium (KCl)	400.0
Bicarbonate de Sodium (NaHCO_3)	2200.0
Chlorure de Sodium (NaCl)	6800.0

Notons une différence importante dans la concentration du bicarbonate sodium ce qui peut probablement expliquer le défaut de croissance des VERO dans le milieu utilisé.

Pour cela, il a été décidé dans cette étude de travailler avec la culture cellulaire des cellules BSR.

II.9.2. Résultat Infection cellulaire : Le virus de la rage de la souche LPS est adsorbé par les cellules BSR au cours d'une période d'incubation de 96 heures, ce qui favorise fortement la réplication virale. Cela permet de récupérer une quantité importante de particules virales.

II.9.3 Récolte : Après 4 à 5 jours d'incubation des boîtes inoculées, les suspensions virales récoltées sont clarifiées par centrifugation à 2500 tours par minute à 4 degrés pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite conservé à -20 degrés pour les inoculations des passages ultérieurs et pour l'évaluation du titre viral.

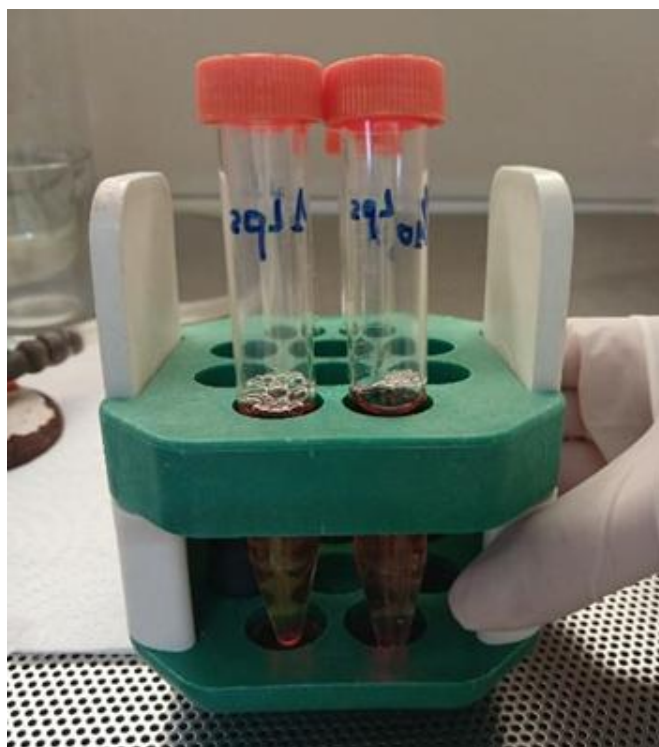


Figure 22 : Récupération du milieu de culture infecté par le virus LPS (Photo personnelle, 2024)

II.9.4 Résultat titrage :

En tenant compte du fait que la technique de titrage avait été réalisée selon la méthode habituelle, il a été surprenant de constater lors de la lecture du Lab-Tek que l'observation au microscope n'était pas conforme aux normes. L'absence de fluorescence verte sur les

cupules a conduit à enquêter pour rectifier le problème. La viabilité du virus a été d'abord vérifiée par injection chez des souris, puis le matériel utilisé a été examiné. Il a été découvert que la qualité du Lab-Tek n'était pas conforme aux normes. Étant donné que la manipulation avait été correcte, cette situation a entraîné une perte de temps considérable et a éloigné de l'objectif initial. Cela a conduit à réaliser le travail une 2^{em} fois pour avoir des résultats fiables.

Après une incubation de 30 minutes à 37°C sous CO₂, rincez les lames avec du PBS, laissez-les sécher, puis lisez-les au microscope. Examiner chaque cupule du Lab-Tek une par une.

1. Après une bonne mise au point, observer des champs de couleur verte.
2. Déplacer la lame sous le microscope tout en comptant le nombre de champs verts dans chaque cupule pour chaque dilution.

Calculer le titre viral par la technique d'immunofluorescence : après l'examen microscopique la surface totale de chaque puits est observée. La méthode de lecture est qualitative : si le puits ne contient aucune cellule fluorescente, le résultat est négatif, si une ou plusieurs cellules fluorescentes sont observées, le résultat est positif

Tableau 03 : Résultat de titrage par la technique d'immunofluorescence.

Dilution	Cupule 1	Cupule 2	Cupule 3	Cupule 4
LPS 1	20	20	20	20
LPS 10⁻¹	20	20	20	20
LPS 10⁻²	20	20	5	4
LPS 10⁻³	20	15	5	5

Calcule : le titre viral final par la méthode de Karber comme suit :

$$- \text{Log}_{10} \text{ dilution terminale} = X - d \left(\frac{\sum r_i}{n} - 0.5 \right)$$

1. X : log 10 de l'inverse de plus faible dilution celle pour laquelle tous les puits sont positifs. Dans ce cas : X=log10
2. d : log 10 facteur de dilution, d= log10 =1

3. n_i : nombre des puits utilisées à chaque dilution après soustraction des puits éliminées dans ce cas $n_i = 8$ puits
4. r_i : nombre des puits positifs parmi n_i .

Tableau 04 : Résultat de calcul de titrage des quatre dilutions.

Titrage	Résultat
Titre initiale (virus pure)	$10^{-4,5}$
Titre de 2 ^{ème} dilution	$10^{-3,7}$
Titre de 3 ^{ème} dilution	$10^{-2,95}$
Titre de 4 ^{ème} dilution	$10^{-2,75}$

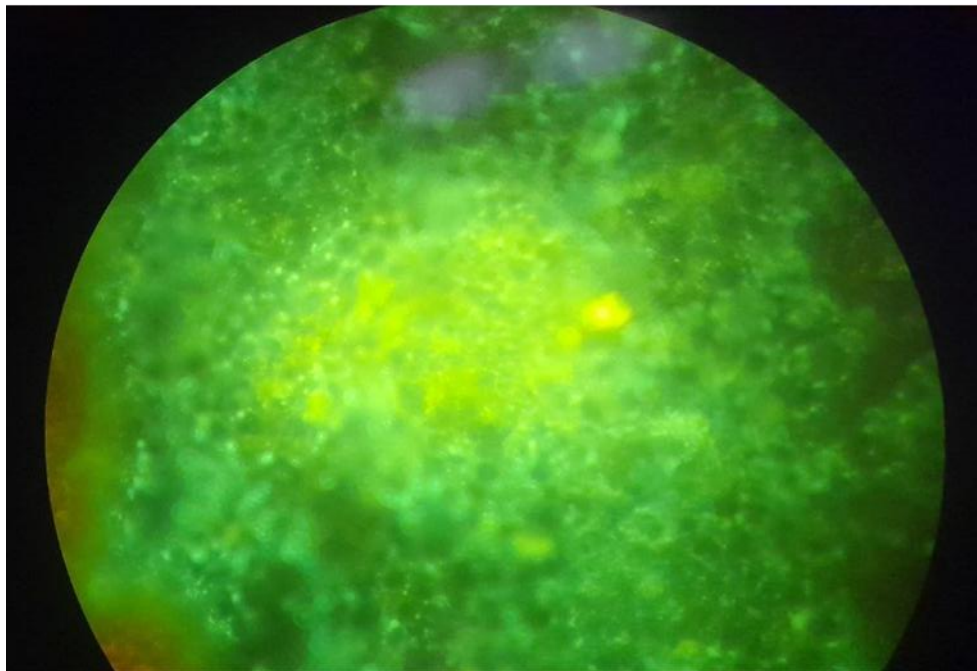


Figure 23 : Observation des champs de pénétration du virus au microscope à fluorescence (personnelle, 2024)

L'utilisation de cultures tissulaires pour la croissance du virus de la rage a été décrite pour la première fois en 1913. À cette époque, on supposait largement que les souches du virus de la rage s'adaptent lentement à la culture in vitro.

En 1978, Smith et ses collaborateurs ont démontré que les souches du virus de la rage pouvaient être facilement isolées dans des neuroblastes. En 1980, il a été montré que les cellules BSR sont également sensibles à la souche LPS.

Dans cette étude, les suspensions collectées et titrées après le premier passage d'adaptation ont montré des titres de $10^{-4,5}$, $10^{-3,7}$, $10^{-2,95}$ et $10^{-2,75}$ respectivement. Il est notable que le titre viral diminue progressivement avec chaque dilution.

Il été également observé que la durée de pénétration du virus dans les cellules BSR, notamment dans le noyau, est courte. Cela s'explique par le grand volume de ce dernier. Ainsi, il est possible de réaliser la lecture le jour même afin d'observer des champs d'immunofluorescence de couleur verte. À chaque dilution, les champs diminuent en raison de l'augmentation de la quantité du milieu à chaque dilution. L'objectif de réaliser quatre dilutions est de choisir et de démontrer que le virus rabique est plus virulent en comparaison à son état pur, où il est moins efficace.

Conclusion :

La rage est l'une des maladies infectieuses les plus mortelles, avec un taux de létalité avoisinant les 100%. Présente sur tous les continents sauf l'Antarctique, la majorité des cas sont signalés en Afrique et en Asie, entraînant des milliers de décès chaque année. Cette situation en fait donc un problème majeur de santé publique.

Le passage à la production cellulaire offre des avantages éthiques en évitant l'inoculation de matières cérébrales animales à l'homme et en raccourcissant la durée de production.

A travers nos résultats axant sur le suivi de processus de fabrication d'un vaccin antirabique cellulaire à usage humain, nous avons constaté que la production de ce dernier sur culture cellulaire suite à l'utilisation de la souche LPS est possible.

Notre travail vise à étudier et à vulgariser le processus de fabrication du vaccin antirabique. Cette étude est réalisée à l'Institut Pasteur, un laboratoire de référence de renommée mondiale.

Il serait également intéressant de développer de nouvelles technologies pour minimiser l'utilisation des animaux de laboratoire.

Références Bibliographiques

Anonyme, Analyse & purification des protéines : tout sur la chromatographie par échange d'ions (IEX), <https://blog.fr.interchim.com/analyse-purification-proteines-chromatographieiex/#:~:text=Chromatographie%20par%20%C3%A9changes%20d%27ions%20%3A&text=La%20technique%20permet%20des%20s%C3%A9parations,et%20une%20r%C3%A9sine%20charg%C3%A9e%20oppos%C3%A9ment> (consulté le 12 avril 2024).

Anonyme, Filtration tangentielle <https://www.siva-unit.com/procedes/procedes-de-filtration-membranaires/filtration-tangentielle/> (consulté le 21 avril 2024).

Anonyme, Fiches d'information général, https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Publications_%20& Documentation/docs/pdf/Chapitre_20final05_202.2.5_Rage.pdf (consulté le 20 mai 2024)

Anonyme. Qu'est-ce que la centrifugation, <https://www.legarrec.com/entreprise/centrifugation/#:~:text=La%20centrifugation%20diff%C3%A9rentielle%20%3A%20les%20%C3%A9chantillons,les%20%C3%A9l%C3%A9ments%20les%20plus%20petits.> (consulté le 21 avril 2024).

Baer, G. (1985). Rabies vaccination of wildlife and domestic animals other than dogs. Rabies in the Tropics, Springer: 270-273.

Barth, R., H. Gruschkau O. Jaeger, L. Milcke (1982). "Purification, concentration and evaluation of rabies virus antigen." Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 5(1-3): 211-216.

Blin, A. (2021). "La fabrication d'un vaccin, un processus très encadré." Actualités Pharmaceutiques 60(606): 45-48.

Bouifergane, F. (2015). "Les vaccins: développement, fabrication et commercialisation." Canoui, E. and O. Launay (2019). "Histoire et principes de la vaccination." Revue des Maladies Respiratoires 36(1): 74-81.

Chakrabarti, P. (2010). "' Living versus Dead":: The Pasteurian Paradigm and Imperial Vaccine Research." Bulletin of the History of Medicine: 387.

Coulanges, P., P.-J. Rakotonirina-Randriambeloma, et Brygoo, E.-R. (1974). "La rage à Madagascar : 20 ans d'utilisation d'un vaccin antirabique phéniqué type Fermi avec virulence résiduelle." Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar.

Fournier-Caruana, J., B. Poirier,,G. Haond , C.Jallet , F.Fuchs ,N.Tordo et P.Perrin.

(2003). "Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method." Biologicals 31(1): 9-16

Fu, Z. F. (1997). "Rabies and rabies research: past, present and future." Vaccine 15: S20-S24. Institut Pasteur d'Algérie. <https://www.pasteur.dz/fr/menu-production/liste-des-produits> (consulté le 20 avril 2024).

Katdare, A. and M. Chaubal (2006). Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery systems, CRC Press.

Koprowski, H. and H. R. Cox (1948). "Studies on chick embryo adapted rabies virus: I. Culture characteristics and pathogenicity." The Journal of Immunology 60(4): 533-554.

Leach, C. N. and H. N. Johnson (1940). "Human Rabies, with Special Reference to Virus Distribution and Titer."

Mammette, A. (2002). Virologie médicale, Presses universitaires de Lyon, 2002-789 pages

Métianu, T., G. Chevallier, et Guillemere . S, (1981). "Vaccination antirabique par voie orale avec des vaccins tués. Premiers résultats." Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France 134(4): 481-490.

Natesan, K., S. Isloor, B. Vinaygamurthy, S. Ramakrishanaich, R. Doddamane et R. Fooks, (2023). "Developments in Rabies Vaccines: The Path Traversed from Pasteur to the Modern Era of Immunization." Vaccines 11(4): 756.

OIE. Manuel terrestre de l'OIE 2005

OIE. Manuel terrestre de l'OIE 2022.

Rappuoli, R. (2014). "1885, the first rabies vaccination in humans." Proceedings of the National Academy of Sciences 111(34): 12273-12273.

Science History Institute/Gregory Tobias
<https://www.sciencehistory.org/education/scientific-biographies/louis-pasteur/> (consulté le 22 mai 2024).

Shi, L., R. Evans, C. J. Burke, (2004). "Improving vaccine stability, potency, and delivery." American pharmaceutical review 7: 100-107.

Soubeyrand, B. (2018). "De la fabrication d'un vaccin à sa mise à disposition en pharmacie." Revue des Maladies Respiratoires 35(10): 1005-1019.

Sureau, P. (1985). Schémas réduits de traitement antirabique avec les nouveaux vaccins de cultures cellulaires. Annales de l'Institut Pasteur/Virologie, Elsevier. In Annales de l'Institut Pasteur/Virologie (Vol. 136, No. 4, pp. 447-452). Elsevier Masson.

Svet-Moldavskija, G. J., O. Andjaparidze, OG, Unanov SS, Karakajumcan MK, Mucnik LS, Hieninson MA, Ravkina LI, Mtvarelidze AA (1965). "An allergen-free antirabies vaccine."

Bulletin of the World Health Organization 32(1): 47.

Tarantola, A. (2018). Epidemiology as a tool to improve prevention of human rabies local and global health implications of postexposure prophylaxis data

Techno-science .<https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Chromatographie-d-exclusion-sterique.html> (consulté le 22 avril 2024).

Vijayakumar, K. et K. R. Jose (2021). "History, evolution and newer perspectives of rabies vaccines." Journal of Veterinary and Animal Sciences: 211-221

Wu, X., T. G. Smith et C.E.Rupprecht, (2011). "From brain passage to cell adaptation: the road of human rabies vaccine development." Expert review of vaccines 10(11): 1597-1608.