

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1990

THESE N° 310

ETUDE D'UNE SOUCHE MUTANTE REVERSE DE
SALMONELLA ABORTUS OVIS
CINETIQUE DE SON VIEILLISSEMENT
UTILISATION POUR LA FABRICATION D'UN VACCIN

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 13 juin 1990

par

Catherine LARUELLE

née le 16 septembre 1963 à Guéret (Creuse)

EXAMINATEURS DE THESE

Monsieur le Professeur NICOLAS	Président
Monsieur le Professeur HABRIOUX	Juge
Monsieur LAVAL, Pharmacien	Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur RABY
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM (1er assesseur)
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférence (2 ième assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

. PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BENEYTOU Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie générale et Minérale
GALEN François-Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie Fondamentale
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie Galénique
NICOLAS Jean-Albert	Bactériologie et Virologie Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES
ADMINISTRATIFS : CELS René

A mes parents,

avec toute mon affection.

A tous ceux qui, par leur présence, leur compréhension, leur amitié,
ont contribué à la réalisation de ce travail.

A Monsieur NICOLAS J.A.

Professeur des Universités de Bactériologie
et Virologie, Parasitologie

Pour nous avoir fait l'honneur de travailler
sous sa direction en nous proposant ce thème de travail,

Pour avoir accepté de présider notre Jury
de Thèse,

Qu'il accepte nos remerciements
respectueux.

A Monsieur HABRIOUX G.

Professeur des Universités de Biochimie
Fondamentale

Pour nous avoir fait l'honneur de
considérer ce travail et de siéger dans notre Jury.

Nous vous prions de croire à toute notre
reconnaissance.

A Monsieur LAVAL G.

Pharmacien d'officine à AUBUSSON (23)

Pour nous avoir fait l'amitié de faire
partie de ce Jury.

Recevez nos remerciements les plus vifs.

Qu'il nous soit permis de rendre ici hommage aux personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail, et plus particulièrement à :

- Madame CORNUEJOLS

Technicienne du secteur Bactériologie du
Laboratoire Départemental de la Haute-Vienne

Nous savons combien votre compétence et votre disponibilité ont été précieuses pour la réalisation de ce travail.

En témoignage de toute ma gratitude.

- Monsieur MICHEL

Biologiste responsable à l'Institut de Biologie
Animale de Montélimar

Pour l'aide précieuse apportée pendant la réalisation de ce travail.

Nous remercions Monsieur Michel et l'ensemble du personnel d'I.B.A. pour leur accueil.

- Madame GUYOT M.F.

La présentation de ce travail a bénéficié de ta compétence.

Je tiens à lui rendre hommage ici, ainsi qu'à ton dévouement.

Avec toute mon amitié.

P L A N

1 ère partie : RAPPELS SUR LA SALMONELLOSE ABORTIVE OVINE

A) DEFINITION DE LA MALADIE

1) Définition bactériologique

1.1. Les entérobactéries

1.1.1. Habitat

1.1.2. Morphologie

1.1.3. Culture

1.1.4. Biochimie

1.2. Les salmonelles

1.2.1. Habitat

1.2.2. Morphologie

1.2.3. Caractères biochimiques

1.3. Salmonella abortus ovis :

Sa structure antigénique

2) Définition clinique de la salmonellose abortive ovine

2.1. Pouvoir pathogène

2.2. Symptomatologie

2.2.1. Chez l'adulte

2.2.2. Chez l'agneau

B) EPIDEMIOLOGIE

1) Epidémiologie analytique

1.1. Sources d'agents pathogènes

1.2. Modes de transmission

2) Epidémiologie synthétique

3) Répartition géographique

C) TRAITEMENT DE LA SALMONELLOSE OVINE

D) PROPHYLAXIE DE LA SALMONELLOSE OVINE

1) Prophylaxie sanitaire

1.1. Mesures offensives

1.2. Mesures défensives

2) Prophylaxie médicale

2.1. Les vaccins tués

2.1.1. Les vaccins tués commercialisés

2.1.2. Les auto-vaccins

2.2. Les vaccins vivants

2 ième Partie : OBTENTION DE LA SOUCHE MUTANTE REVERSE DE
SALMONELLA ABORTUS OVIS

A) OBTENTION D'UN MUTANT REVERSE DE BRUCELLA MELITENSIS
PAR HERZBERG ET ELBERG

1) Obtention de souches streptomycino-dépendantes

2) Isolement des souches réverses

B) OBTENTION DE LA SOUCHE MUTANTE REVERSE DE
SALMONELLA ABORTUS OVIS

1) Matériel

1.1. Souches

1.1.1. Provenance

1.1.2. Identification

1.2. Milieu

1.3. Antibiotique

1.3.1. Généralités sur la streptomycine

1.3.2. Critères de choix

1.3.2.1. Obtention facile de mutants

1.3.2.2. Obtention de mutants stables
génétiquement

1.3.3. Concentrations choisies

2) Obtention de mutants streptomycino-dépendants

2.1. Obtention de mutants streptomycino-
résistants

2.2. Sélection de mutants streptomycino-
dépendants

3) Obtention de mutants réverses

3 ième Partie : LES CARACTERISTIQUES DE LA SOUCHE VACCINALE

A) CARACTERES ETUDIES IN VIVO

1) Chez la souris

1.1. Virulence résiduelle

1.2. Degré de protection

1.3. Stabilité

2) Chez l'ovine : Hôte spécifique de Salmonella abortus

ovis

- 2.1. Pouvoir immunogène
- 2.2. Innocuité sur brebis gestantes
- 2.3. Stabilité

B) MARQUEURS DE LA SOUCHE SAO 24337 1400 Rv MIS EN EVIDENCE IN VITRO

- 1) Caractères biochimiques
- 2) Caractères culturels : temps de croissance
- 3) Travaux de Coussens : recherche d'un marqueur biochimique de SAO 24337 1400 Rv
 - 3.1. Fermentations sucrées
 - 3.2. Recherche d'enzymes

C) RESUME DES CARACTERISTIQUES DE LA SOUCHE MUTANTE REVERSE SAO 24337 1400 Rv : SA FICHE D'IDENTITE

4 ième Partie : CINETIQUE DU VIEILLISSEMENT DE LA SOUCHE

A) LYOPHILISATION DE LA SOUCHE

- 1) Principe de la lyophilisation
- 2) Matériel
- 3) Protocole suivi au laboratoire
- 4) Caractéristiques d'un produit lyophilisé - Modalités de conservation

B) LA CINETIQUE DU VIEILLISSEMENT D'UN VACCIN VIVANT
LYOPHILISE

- 1) Buts de l'expérimentation
- 2) Etude de l'influence de la durée de conservation sur le titre avec une reprise en eau physiologique tamponnée ou avec un solvant coloré

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel proprement dit

2.1.2. Le vaccin

2.1.3. Les milieux

2.1.3.1. Milieux de reprise du lyophilisat

2.1.3.2. Milieu solide servant au dénombrement

2.2. Technique

2.3. Résultats

- 3) Evolution du titre du vaccin après reprise par un solvant

3.1. Matériel

3.2. Méthodes

3.3. Résultats

- 4) Vieillissement accéléré à l'étuve à 37 °C

4.1. Matériel

4.2. Méthodes

4.3. Résultats

5) Interprétations des résultats

5.1. Critiques de la méthode

5.2. Influence de la durée de conservation d'un vaccin vivant lyophilisé sur sa teneur en germes ; étude comparée entre deux solvants de reprise, l'eau physiologique tamponnée et un solvant coloré

5.2.1. Reprise du lyophilisat par de l'eau physiologique tamponnée

5.2.2. Reprise du lyophilisat par un solvant coloré

5.3. Influence du temps de contact d'un vaccin vivant lyophilisé avec son solvant sur la teneur en germes. Etude comparée entre deux solvants de reprise : l'eau physiologique tamponnée et un solvant coloré

5.3.1. Reprise du lyophilisat par de l'eau physiologique tamponnée

5.3.2. Reprise du lyophilisat par un solvant coloré

5.4. Conclusions

5 ième Partie : UTILISATION POUR LA FABRICATION D'UN VACCIN

1) La forme lyophilisée

1.1. Intérêt de cette forme galénique

1.2. Conditions de mise en place du protocole de lyophilisation

1.3. Critères définissant la lyophilisation effectuée

1.3.1. Choix du milieu de lyophilisation

1.3.2. Teneur en germes avant lyophilisation

1.3.3. Remplissage des unités de conditionnement

1.3.4. Paramètres de la lyophilisation

1.4. Contrôles effectués après la lyophilisation

1.4.1. Aspect du produit

1.4.2. Masse du lyophilisat et teneur en eau

2) Le colorant

3) La teneur en germes

3.1. Rappel des travaux déjà effectués

3.2. Comment contrôler le titre du vaccin ?

4) La présentation du vaccin

4.1. Composition du vaccin

4.2. Réipients

4.3. Etiquetage

5) Utilisation du vaccin

5.1. Les indications

5.2. Le protocole d'emploi

5.3. Le suivi médical

5.4. Le pouvoir immunitaire du vaccin.

INTRODUCTION

Les salmonelles, vaste famille d'entérobactéries, constituent depuis longtemps un sujet important de réflexion et de recherche pour les biologistes. Les recherches existent sur ces germes tant en Médecine Humaine pour réaliser une prophylaxie dans les zones où sévit la fièvre typhoïde qu'en Pathologie Vétérinaire où de nombreux sérotypes comme Salmonella typhimurium ou Salmonella enteritidis jouent un rôle important dans de nombreuses espèces et où Salmonella abortus ovis est responsable d'avortements épidémiques dans les régions moutonnières de l'ensemble du globe.

Soucieux de contribuer à l'éradication de la salmonellose ovine très présente dans la région du Centre-Ouest, le Laboratoire Départemental de la Haute-Vienne a isolé une souche vaccinale vivante, de virulence atténuée contre cette maladie.

Après avoir fait quelques rappels sur la maladie, nous présenterons dans ce mémoire les différentes étapes de l'obtention de cette souche.

Dans un deuxième temps, notre travail consistera à étudier les modalités de lyophilisation permettant de donner à cette souche une forme galénique compatible avec son utilisation comme vaccin. Dans cet objectif, nous étudierons la cinétique du vieillissement de la souche lyophilisée et les différents paramètres pouvant influencer le titre du vaccin au moment de son utilisation.

Riches de nos différents résultats, nous proposerons enfin un modèle de vaccin vivant contre la salmonellose ovine.

1 ère partie :

**RAPPELS SUR LA
SALMONELLOSE ABORTIVE
OVINE**

A) DEFINITION DE LA MALADIE

1) Définition bactériologique

Le germe responsable de cette maladie est Salmonella abortus ovis. Il engendre chez les ovins une toxi-infection contagieuse se traduisant le plus fréquemment :

- chez l'animal adulte par des avortements,
- chez le jeune par des septicémies le plus souvent mortelles.

Dans une classification taxonomique des bactéries, Salmonella abortus ovis appartient :

- au genre Salmonella
- à la famille Enterobacteriaceae.

1.1. Les entérobactéries

1.1.1. Habitat

Ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme ou des animaux. C'est ainsi qu'elles ont été regroupées sous cette dénomination commune d'"entérobactéries".

1.1.2. Morphologie

Ce sont des bacilles, gram -, généralement mobiles (sauf Salmonella gallinarum pullorum immobile).

1.1.3. Culture

Les entérobactéries sont des germes aéroanaérobies facultatifs.

Elles poussent facilement sur les milieux usuels sur lesquelles elles donnent des colonies lisses type Smooth. Notons cependant qu'elles deviendront aisément rugueuses (type Rough) par l'intermédiaire de cultures successives.

1.1.4. Biochimie

- . Elles réduisent les nitrates en nitrites.
- . Elles n'ont pas d'oxydase.
- . Elles sont capables d'utiliser le glucose et d'autres sucres par voie fermentative.

La détermination de l'identité biochimique (la plus précise) d'une entérobactérie permettra de faire une différenciation de genre.

1.2. Les salmonelles

1.2.1. Habitat

Ce sont des bactéries pathogènes pour l'homme et/ou pour les animaux. Elles sont souvent liées à une contamination orale.

1.2.2. Morphologie

Ce sont des entérobactéries presque toujours mobiles.

1.2.3. Caractères biochimiques

Ils ont permis de faire le diagnostic de genre.

- . Elles ne fermentent pas le lactose.
- . Elles ne produisent pas d'indole.
- . Elles dégradent le mannitol.
- . Au niveau enzymatique :
 - elles possèdent une lysine-décarboxylase.
 - elles n'ont ni bétagalactosidase, ni uréase, ni tryptophane-désaminase.

1.3. Salmonella abortus ovis : sa structure antigénique

Le diagnostic d'espèce est fait sur l'étude de la structure antigénique. En effet, le genre Salmonella est constitué de plus de 2 000 sérotypes caractérisés par 3 antigènes : Ag O, Ag H et Ag K.

L'antigène O :

. C'est une endotoxine de nature glucido-lipido protidique : la fraction protidique est responsable de l'antigénicité, la fraction glucidique détermine la spécificité de l'antigène et la fraction lipidique est à l'origine de la toxicité du germe.

. Il est agglutinable par les agglutinines O (anticorps spécifiques de l'Ag O) sous forme d'une agglutination lente, fine et granulaire ; les petits amas formés sont difficiles à dissocier. Ces propriétés sont mises à profit dans les sérodiagnostics.

. L'Ag O s'exprime seulement lorsque la salmonelle est sous forme Smooth, c'est-à-dire virulente.

. Cette endotoxine est thermostable, alcoolostable, mais détruite par le formol.

. Il existe au sein de cet Ag plusieurs facteurs sérologiquement différents : Kauffman et White ont montré que chaque sérotype était constitué par une partie seulement de ces facteurs, qu'ils ont numérotés de 1 à 61.

L'antigène K : antigène de surface.

. Il constitue une structure invisible entourant le corps bactérien des salmonelles pathogènes pour l'homme : c'est l'Ag Vi. Il n'est cependant pas le support de la virulence. SAO ne possède pas cet antigène.

. Il peut inhiber l'agglutinabilité liée à l'antigène O.

L'antigène H :

. On parle encore d'Ag flagellaire ; c'est une structure caractéristique des entérobactéries mobiles et en particulier des salmonelles. Il est en effet porté par les flagelles.

. Il est de nature protéinique.

. Mis en contact avec son Ac spécifique, l'agglutinine H, il donne une agglutination rapide, lâche et partant, facilement dissociable (utilisation pour le sérodiagnostic).

. Il est résistant à l'action du formol, mais sensible à la chaleur et à l'alcool.

. Particularité : au sein d'un même genre, l'Ag H peut s'exprimer de la même façon pour toutes les bactéries ou bien sous deux formes distinctes. Dans le premier cas, qui est relativement rare, on parle de souche monophasique. Dans le deuxième cas, beaucoup plus fréquent, la souche est dite biphasique et l'Ag H a alors une structure phase 1 et une structure phase 2.

Le schéma de Kauffman et White établit une classification des différentes espèces de salmonelles en fonction de leur structure antigénique complète et permet ainsi de faire des diagnostics d'espèces.

Formule antigénique de Salmonella abortus ovis

<u>Groupe</u>	<u>Antigène O</u>	<u>Antigène H</u>	
B	1, 4, 12, 27	phase 1 C	phase 2 1, 6

2) Définition clinique de la salmonellose abortive ovine

La salmonellose abortive du mouton est une pathologie de type toxoinfection ; en effet, l'expression de la maladie est due à deux phénomènes parallèles :

- envahissement de l'organisme par des bactéries,
- libération d'une toxine au sein de l'organisme.

2.1. Pouvoir pathogène

La contamination se fait le plus fréquemment par voie orale.

Les bactéries envahissent l'ensemble de l'appareil digestif et on assiste ainsi à une première phase digestive :

- grâce à des enzymes particuliers, les salmonelles vont être capables d'utiliser des nutriments glucidiques et protidiques et donc de se multiplier très rapidement et très intensément dans cet appareil digestif.

- la lyse des bactéries, au niveau intestinal, va conduire à la libération d'endotoxine, responsable d'une inflammation locale de la muqueuse.

- cette lésion inflammatoire évolue vite vers une nécrose puis une ulcération de la muqueuse.

Cette phase digestive est alors suivie par une phase hépatique et sanguine :

en effet, à partir des lésions nécrotiques précédemment décrites, les bactéries gagnent la circulation sanguine (à ce moment, une bactériémie est décelable), puis le foie par l'intermédiaire du système porte hépatique. Des lésions hépatiques peuvent ici être mises en évidence.

Parallèlement à cette diffusion sanguine existe une migration lymphatique ; cependant, les ganglions constituent des filtres efficaces et arrêtent les salmonelles qui peuvent alors séjourner en leur sein de plusieurs jours à plusieurs mois.

Une phase organique constitue le troisième temps de cette pathogénie :

chez l'ovin adulte, Salmonella abortus ovis a un tropisme marqué pour les organes génitaux.

Ainsi, chez la femelle gravide, elle provoque une atteinte du placenta dont résulte la mort (in utéro) du fœtus par perturbations des échanges entre la mère et l'embryon. Parallèlement, cette atteinte placentaire induit une irritation des terminaisons nerveuses qui, par voie réflexe entraîne la contraction de l'utérus et l'avortement.

Remarque : l'atteinte de l'utérus se fait essentiellement par voie sanguine, mais également par contamination directe lors du coït.

Chez le jeune, différents organes peuvent être atteints ; notons l'existence fréquente de lésions pulmonaires.

2.2. Symptomatologie

2.2.1. Chez l'adulte

La principale manifestation est l'avortement, c'est-à-dire l'expulsion de l'agneau mort né ou succombant dans les 48 heures suivant la naissance. On décrit trois modes d'évolution de la maladie :

- Forme suraiguë :

elle se traduit par la mort de l'animal en 48 heures.

C'est un mode d'évolution très rare, constituant surtout une forme expérimentale d'étude de la maladie ; l'équipe de Tadjebakhche, en particulier, a décrit cette forme après infection expérimentale d'animaux par voie intraveineuse (56).

- Forme aiguë :

c'est la forme la plus courante : elle aboutit à un avortement. Celui-ci est en général précédé de signes digestifs à type d'inappétence, et d'un écoulement vaginal apparaissant 1 à 2 jours avant l'avortement.

- Forme chronique : il s'agit de la forme la plus conséquente épidémiologiquement. En effet, on peut la qualifier d'insidieuse car elle est asymptomatique. La mise bas a lieu tout à fait normalement mais, elle s'accompagne pourtant de l'excrétion de salmonelles. La maladie est alors à même de se propager rapidement.

2.2.2. Chez l'agneau

L'infection bactérienne se traduit par une septicémie apparaissant soit à la naissance, soit au cours des premières semaines de vie de l'animal. Les auteurs bulgares ont déterminé un taux de mortalité pouvant aller jusqu'à 20 % pendant les premiers mois avec un syndrome pneumoentérique.

Selon Jack (18), on peut distinguer deux tableaux cliniques :

- les agneaux naissent faibles et meurent dans les quelques heures qui suivent la naissance.
- les agneaux naissent normaux mais tombent malades brutalement et meurent avec un tableau de pneumonie lobulaire caractéristique.

B) EPIDEMIOLOGIE

1) Epidémiologie analytique

1.1. Sources d'agents pathogènes

- Animaux malades

Ils constituent une source de contamination considérable. En effet, après l'avortement, les brebis excrètent des quantités importantes de bactéries dans le milieu extérieur, non seulement dans les sécrétions vaginales, mais également dans les urines, les fèces ou le lait.

De nombreuses études ont été publiées sur ce sujet, mais les résultats des auteurs divergent pour ce qui est de la durée de cette excrétion (18-35-54).

Notons encore que de nouvelles excrétions de germes auront lieu au moment des chaleurs et lors des parturitions ultérieures.

- Porteurs sains

Leur importance n'est pas liée à leur nombre mais plutôt au caractère insidieux de leur existence. Par ce fait, nous ne pouvons les négliger.

- Béliers

Bien que probable, leur rôle n'est pas certain. Plusieurs études ont été menées sans qu'aucune ne démontre que le bélier soit capable d'excréter des bactéries (4-24-53).

- Cadavres

Il est évident qu'ils sont très riches en salmonelles. Ils ne constituent pas pour autant une source importante d'agents contaminants, l'homme pouvant aisément intervenir à ce niveau.

- Milieu extérieur

Le rôle potentiel du milieu extérieur ne peut être négligé dans la propagation de la maladie, en effet, Salmonella abortus ovis est un germe très résistant dans le milieu extérieur (57).

1.2. Modes de transmission

Transmission directe

Elle nécessite un contact étroit entre les animaux :

- Rôle du bélier

Bien que le rôle du bélier dans la salmonellose abortive ovine soit discuté, des études ont montré que l'introduction d'un bélier porteur du germe dans un troupeau sain était suivi d'une série d'avortements salmonelliques.

La contamination se fait au moment du coït. Il s'agit d'une transmission directe.

- Infection du jeune

Que ce soit pendant sa vie foetale, par voie sanguine, ou bien à la naissance, l'agneau est contaminé par sa mère par transmission directe.

Transmission indirecte :

Il s'agit du mode de transmission le plus important. Elle se fait par l'ingestion d'aliments souillés ; Salmonella abortus ovis est un germe très résistant qui peut survivre longtemps dans le sol.

L'homme et certains animaux comme le chien ou les oiseaux constituent des vecteurs de l'infection.

Dans un troupeau sain, ce type de contamination parait, au départ, moins massif. En effet, seuls les animaux les plus fragiles seront atteints, c'est-à-dire les jeunes, les brebis gestantes ou encore les animaux stressés. Mais, dans un deuxième temps ces animaux excrètent des matériaux souillés qui vont propager la maladie. Ils constituent des amplificateurs de contamination.

La salmonellose abortive ovine est donc une maladie très contagieuse.

2) Epidémiologie synthétique

La salmonellose ovine est une maladie très contagieuse de nature enzootique. A partir d'un foyer infecté, la maladie se propage d'élevage en élevage comme une tâche d'huile qui, très vite, couvre une région entière.

Elle est introduite dans un élevage lors de mélange de troupeaux ou à la suite de transactions commerciales de porteurs sains.

Au sein d'un même élevage, tout va très vite et il est donc très important pour les éleveurs de prendre certaines mesures prophylactiques (retrait et destruction des différentes excréments ; isolement des animaux malades).

3) Répartition géographique (carte 1)

C'est une pathologie infectieuse des grandes régions moutonnières.

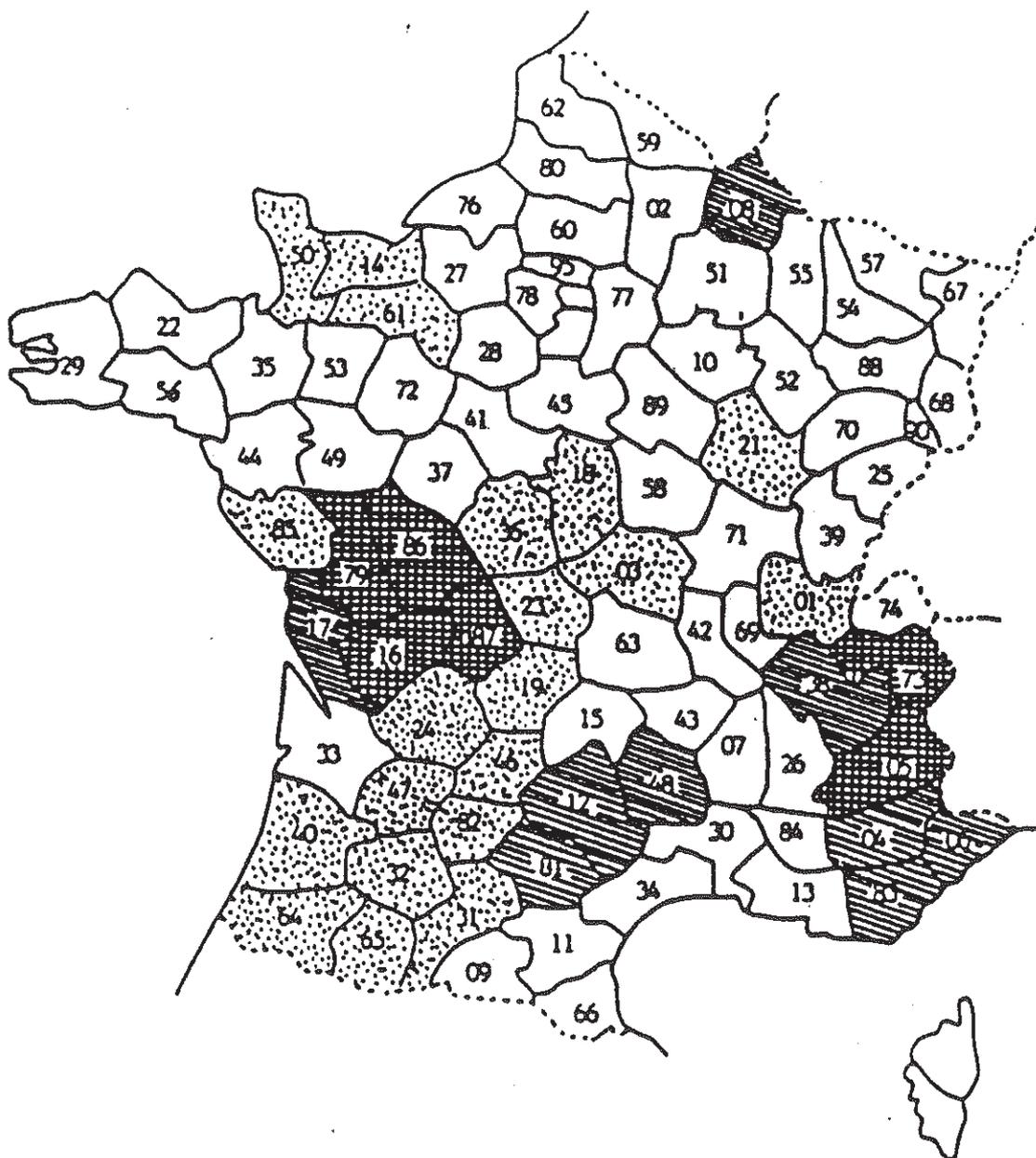
A l'échelle du globe, la salmonellose ovine est notable :

- En Grande-Bretagne où elle est endémique,
- Dans les pays d'Europe centrale et d'Europe de l'est et en particulier en Bulgarie,
- En Iran,
- En Australie,
- En Inde

En France, cette pathologie prend toute son importance :

- dans le Centre-Ouest (Charente, Deux-sèvres, Vienne et Haute-Vienne)
- dans le Sud-Est (Savoie, Hautes-Alpes).

Une analyse des causes d'avortements infectieux diagnostiqués au Laboratoire Départemental de Limoges sur plusieurs années montre que Salmonella abortus ovis est responsable de 50 à 60 % de ces avortements dans cette région (5-8).



Carte n° 1 : Répartition des avortements dûs à *Salmonella abortus ovis* en France.

Légende :



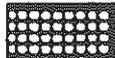
pas d'avortement salmonellique recensé



taux des avortements dûs à *Salmonella abortus ovis* inférieurs à 1% des avortements infectieux



taux compris entre 1 et 10%



taux supérieur à 10%

C) TRAITEMENT DE LA SALMONELLOSE OVINE

D'une manière générale, les salmonelles sont des germes sensibles aux antibiotiques. Cependant, les résultats des différents protocoles proposés montrent les limites d'une thérapeutique médicamenteuse pour la salmonellose ovine :

- il a rarement été démontré que la chimiothérapie avait des effets bénéfiques sur cette maladie (41).

- les protocoles sont souvent complexes.

- le coût du traitement n'est pas négligeable.

Les antibiotiques le plus souvent utilisés sont le chloramphénicol, les tétracyclines, l'ampicilline, la streptomycine, la furazolidone ou l'association triméthoprime-sulfamide.

Une antibiothérapie ne sera jamais mise en place sans qu'un diagnostic direct, de certitude n'ait été fait, de même qu'un antibiogramme. En effet, une antibiothérapie trop précoce a, non seulement aucune efficacité, mais en outre fatigue les animaux, les rend plus vulnérables (les posologies sont élevées et les administrations répétées) et favorise l'apparition de souches résistantes.

Quelques protocoles proposés :

- Delahaye préconise l'injection de 50 à 150 mg par kg de chloramphénicol (9).

- Ivanov et Stamenov ont testé 7 antibiotiques sur 10 souches de Salmonella abortus ovis ; les tétracyclines et la furazolidone se sont révélées être les plus efficaces (17).

- Yalcin propose deux injections à 48 heures d'intervalle de l'association tétracyclines + chloramphénicol sur toutes les femelles gestantes (59).

- Girard a montré l'efficacité de l'ampicilline. Ce traitement a l'inconvénient d'être très onéreux (13).

- Nicolas a montré l'efficacité de 3 injections de 1 g de chloramphénicol toutes les 36 heures, série d'injections à renouveler tous les 18 jours. Une thérapeutique plus prolongée, constituée de 6 injections serait plus efficace ; mais des problèmes non négligeables se posent : coût très important, manipulations trop lourdes (31).

- Dupré utilise le chloramphénicol différemment : dès le début des avortements et pendant 3 semaines, 2 injections de 1 g de chloramphénicol à 24 heures d'intervalle puis 0,5 g par brebis et par jour, par voie orale (8).

- enfin, l'équipe de Barrois et Meaude a mis en évidence l'intérêt des tétracyclines et, en particulier de la terramycine. Ils proposent l'injection unique de 1 ml de terramycine longue action ND pour 10 kg de poids (soit 200 mg de dihydrate d'oxytétracycline) renouvelée 14 jours plus tard (2).

Est également pratiquée l'injection 3 jours de suite de 100 mg par kg et par jour de tétracycline.

D) PROPHYLAXIE DE LA SALMONELLOSE OVINE

Comme dans toute maladie infectieuse, la prophylaxie de la salmonellose ovine est très importante, et ce d'autant plus que le médicament ne donne pas de résultats complètement satisfaisants.

Il est cependant assez difficile de la rendre très efficace, aussi bien du point de vue sanitaire que médical.

1) Prophylaxie sanitaire

Les caractéristiques épidémiologiques de la maladie justifient les difficultés importantes rencontrées par les éleveurs pour effectuer une bonne prophylaxie.

Il sera proposé malgré tout deux grands types de mesures selon que l'élevage est sain (mesures défensives) ou qu'il a subi des avortements (mesures offensives).

1.1. Mesures offensives

Dès que des avortements ont eu lieu dans une exploitation, l'éleveur doit se fixer trois pôles d'action :

- isolement des animaux malades (brebis ayant avorté),
- destruction des avortons et de toutes les enveloppes foetales,
- désinfection :
 - . des litières avec des superphosphates,
 - . des locaux et du matériel avec les antiseptiques usuels.

Remarque : Dans une étude effectuée dans les Bouches du Rhône, Le Terrier propose d'effectuer un examen sérologique sur l'ensemble des animaux de l'élevage et de procéder à l'abattage de tous les animaux sérologiquement positifs (23).

Cette proposition, bien qu'intellectuellement satisfaisante, est cependant très difficile à mettre en place dans la pratique.

1.2. Mesures défensives

Elles visent à protéger les élevages encore sains d'une éventuelle contamination.

Une bonne prévention s'accompagnera toujours de bonnes conditions d'élevage :

- alimentation de qualité,
- parasitisme bien contrôlé,
- absence de stress qui pourrait être engendré par des changements brusques de régime ou encore de température.

Parallèlement à ces précautions assez peu exigeantes, l'éleveur devra effectuer des transactions commerciales prudentes. Il est en effet indispensable de contrôler rigoureusement les animaux nouvellement introduits dans un troupeau. Dans l'idéal, il devrait y avoir :

- enquête préalable quant à l'origine de l'animal,
- prise de sang pour contrôle sérologique,
- mise en quarantaine de l'animal.

Bien que très intéressante, la prophylaxie sanitaire n'est pas suffisante à l'éradication de la salmonellose ; aussi de nombreuses recherches ont été et sont encore effectuées pour mettre au point une prophylaxie médicale efficace.

2) Prophylaxie médicale

La notion de prophylaxie médicale est associée à celle de vaccination. De nombreuses études ont donc été effectuées pour mettre au point le vaccin idéal, c'est-à-dire ayant une parfaite innocuité, un fort pouvoir immunogène et une utilisation facile.

Plusieurs essais ont été faits avec des vaccins tués et des vaccins vivants.

2.1. Les vaccins tués

Nous en distinguerons deux types :

- les vaccins préparés industriellement et commercialisés.
- les auto-vaccins.

2.1.1. Les vaccins tués commercialisés

Ce sont des associations vaccinales de Salmonella abortus ovis et d'autres germes abortifs ou non. Elles sont assez largement commercialisées malgré la protection limitée qu'elles procurent et leur absence de spécificité.

2.1.2. Les auto-vaccins

Ils sont eux caractérisés par leur spécificité : ils sont en effet préparés au laboratoire à partir d'une souche sauvage isolée dans l'élevage à vacciner.

Leur préparation :

- vérification de la pureté et de l'identité de la souche par un raisonnement bactériologique classique : coloration de gram, isolement sur boîte, mise en évidence des caractères biochimiques, mise en évidence du caractère Smooth.
- ensemencement sur bouillon nutritif, 6 heures, à 37 ° C.
- ensemencement sur gélose tryptose en flacons de Roux. Incubation 18 heures à 37 ° C.
- récupération d'une suspension de salmonelles par lavages de la surface de la gélose à l'eau physiologique.
- dénombrement de la suspension bactérienne par dilutions.
- inactivation des germes par la chaleur ou le formol à 3 o/oo.

- contrôles de stérilité.
- la préparation vaccinale est alors adjuvée par des substances huileuses.
- contrôles d'innocuité.

Les protocoles de vaccination :

Deux protocoles sont proposés selon l'état de l'animal :

* Brebis ou agnelles vides :

Injection de (- 5 ml 1 mois avant la mise au bélier
(
(- 5 ml 1 mois après la mise au bélier
(
(- 5 ml à la fin du 2 ième mois de gestation

* Brebis gestantes :

Deux injections de 5 ml seront faites entre le premier et le quatrième mois de gestation.

Les auto-vaccins ont été testés sur le terrain par différents auteurs. Plusieurs remarques ou critiques sont intéressantes à rapporter :

. Tadjebakhche et coll. (56) ont testé le principe de l'auto-vaccin sur le terrain : deux lots de brebis ont été sélectionnés, l'un a été vacciné avec l'auto-vaccin, l'autre non. Dans un deuxième temps, l'ensemble des animaux a été inoculé par voie veineuse avec des germes vivants. On constate que toutes les brebis avortent mais, en outre, les brebis non vaccinées meurent. L'administration de l'auto-vaccin a ainsi protégé les brebis de la mort (forme suraiguë de la salmonellose) ; le fait que les animaux aient avorté est lié au choix de la voie d'inoculation.

. Le vaccin inactivé à la chaleur procure une meilleure immunité que celui inactivé par le formol à 3 o/oo.

. Jack (18) a évalué l'efficacité de ce type de vaccination en comparant l'immunité procurée par différents auto-vaccins préparés par ses soins. Il a été conclu que l'auto-vaccination n'était pas une technique complètement satisfaisante.

. Nicolas (30) a montré l'intérêt d'une troisième injection : l'immunité procurée aux animaux semble plus durable. En effet, le Professeur Nicolas explique que cet ensemble d'injections crée un état d'hyperimmunisation associé à une protection satisfaisante des femelles vaccinées.

Malgré l'inconstance des résultats obtenus avec ces vaccins, ils demeurent très utilisés. Mais la recherche s'oriente vers les vaccins vivants.

2.2. Les vaccins vivants

Les vaccins vivants sont intéressants dans la mesure où, d'une part ils procurent une immunité plus précoce et plus durable, d'autre part ils entrent dans un protocole de vaccination allégé.

En 1967, Dragonov et Pejtschev ont obtenu de bons résultats avec un vaccin vivant préparé avec une culture de Salmonella abortus ovis en eau peptonée pendant 18 heures. Ce vaccin titrait $35 \cdot 10^7$ germes par ml.

Dans le début des années 70, une publication de Watson rapporte l'efficacité d'une vaccination naturelle qui consisterait en la mise en contact d'agnelles impubères avec des brebis ayant avorté. Cette méthode limite le nombre d'avortements mais cependant augmente le nombre de porteurs de germes.

Au Laboratoire Départemental de Limoges, l'équipe du Professeur Nicolas a conduit plusieurs expérimentations (28-29) avec un vaccin vivant. Ainsi, il a montré l'intérêt et les limites de l'administration par voie orale d'une suspension de germes vivants et virulents (titre : 9.10^4 germes par ml). Cette vaccination s'est montrée efficace : le nombre d'avortements a diminué. Une augmentation précoce des anticorps a pu être mise en évidence, anticorps qui cependant disparaîtront rapidement pour devenir non significatifs au bout de 6 mois. Nicolas explique l'efficacité de cette vaccination :

- l'ingestion orale de germes déclenche des mécanismes immunitaires de type cellulaire, beaucoup plus efficaces que l'immunité humorale procurée par les vaccins tués.

- on peut établir un parallélisme entre la contamination naturelle (le plus souvent orale) et ce type de vaccination. Pourtant, cette utilisation de vaccins oraux n'est pas dépourvue d'inconvénients : trop d'animaux sont tués par l'administration de vaccins virulents (2 sur 10 dans l'expérimentation de l'équipe de Nicolas).

D'autres recherches sont donc nées dans le but d'obtenir des vaccins vivants de virulence atténuée.

Nous distinguerons les vaccins vivants de virulence atténuée obtenus naturellement, et ceux obtenus artificiellement.

* souches naturellement atténuées : la mutation de la souche sauvage vers une virulence moins grande serait obtenue après des passages multiples in vivo. Il apparaît clairement combien il est difficile de dominer un tel travail long et fastidieux : il ne sera pas utilisé pour la fabrication de souche vaccinale.

* souches artificiellement atténuées : elles sont très faciles à obtenir et très immunogènes.

Nicolas et coll. se consacrent depuis plusieurs années à l'obtention d'une souche vivante, de virulence atténuée, ayant un avenir comme vaccin.

2 ième partie :

**OBTENTION DE LA SOUCHE
MUTANTE REVERSE
de SALMONELLA ABORTUS OVIS**

Alors que nous venons de rappeler les caractéristiques de la salmonellose ovine, soulignant ses conséquences sérieuses pour les éleveurs, mais aussi les limites du traitement et de la prophylaxie, nous comprendrons aisément que les recherches tentent de mettre au point un vaccin plus efficace. Ainsi, Pardon (INRA) et Nicolas au Laboratoire Départemental de Limoges ont isolé un mutant réverse de Salmonella abortus ovis, vaccin vivant de virulence atténuée.

Après avoir rappelé les travaux d'Herzberg et Elberg qui serviront de base à notre raisonnement, nous décrirons les différentes étapes de l'obtention du mutant que nous avons isolé à Limoges.

A) OBTENTION D'UN MUTANT REVERSE DE BRUCELLA MELITENSIS
PAR HERZBERG et ELBERG

Herzberg et Elberg (14-15) ont travaillé sur la fabrication d'un vaccin vivant de virulence atténuée contre la brucellose. L'idée était que la meilleure protection de l'animal serait obtenue en déclenchant une affection liée à une multiplication bactérienne, mais de courte durée afin d'éviter toute lésion tissulaire.

1) Obtention de souches streptomycino-dépendantes

- Principe :

Différentes souches de Brucella melitensis ont été mises en culture sur des géloses contenant différentes concentrations de streptomycine. On a alors isolé des colonies qui, non seulement poussaient malgré la présence de streptomycine, mais en plus ne poussaient que si le milieu contenait l'antibiotique. Les conditions optimales de culture ont été déterminées (concentration de streptomycine, temps d'incubation).

- Intérêt :

Ces souches possèdent le même antigène que la souche sauvage de Brucella melitensis mais sont de virulence atténuée. Elles sont incapables d'induire des lésions tissulaires chez l'hôte.

- Limites :

In vivo, chez le cobaye et la souris, nous retrouverons les mutants dans la rate des animaux ; mais nous constaterons que ces souches sont incapables de se multiplier in vivo.

Une étude comparée avec les vaccins tués montrera que ces souches streptomycino-dépendantes ne procurent pas une meilleure immunité que ces derniers. Herzberg et Elberg en conclurent que cela était dû à l'incapacité de ces mutants de se multiplier chez l'hôte.

2) Isolement de souches réverses

Devant les résultats insatisfaisants procurés par les souches streptomycino-dépendantes, Herzberg et Elberg ont centré leurs recherches sur de nouvelles souches, mutant à partir des souches streptomycino-dépendantes. En effet, certaines parmi ces dernières redeviennent capables de se développer sur un milieu dépourvu de streptomycine. Ils ont isolé ces bactéries réverses ou "mutants de seconde génération" et les ont mis en culture sur une gélose sans antibiotique.

Intérêts :

On a défini les caractères cultureux et montré la stabilité de ces mutants.

Des expérimentations in vivo chez le cobaye et la souris ont mis en évidence la virulence réduite de ces souches et leur grand pouvoir immunogène. Les différentes observations décrivent le même mécanisme : le mutant réverse se comporte chez son hôte comme un agent virulent : il se multiplie dans l'organisme. Mais nous observons une régression très rapide des lésions, ce qui différencie cette évolution de celle observée avec la souche sauvage.

Face à ces résultats encourageants, différents chercheurs ont étudié ce mutant réverse de Brucella melitensis Rev 1 chez la chèvre et chez le mouton. Tous les auteurs ont conclu à l'efficacité de ce type de vaccination (1-10).

B) OBTENTION DE LA SOUCHE MUTANTE REVERSE DE SALMONELLA ABORTUS OVIS

Ces travaux originaux de Herzberg et Elberg sur Brucella ont servi de trame à plusieurs équipes, dont celle du Professeur Nicolas à Limoges, pour rechercher un mutant de virulence atténuée de Salmonella abortus ovis (3-5-43)

1) Matériel

1.1. Souches

1.1.1. Provenance

Nous avons travaillé sur un ensemble de souches sauvages de Salmonella abortus ovis isolées au Laboratoire d'Analyses et de Recherche de la Haute-Vienne, à partir de brebis malades. L'isolement se fera le plus souvent à partir de l'utérus, du placenta ou du fœtus ; certains prélèvements d'écoulements vaginaux seront également utilisés.

L'isolement et la purification des souches sauvages de Salmonella abortus ovis se feront classiquement par des repiquages successifs sur différents milieux plus ou moins sélectifs.

1.1.2. Identification

L'identification de chacune de ces souches est faite grâce à la mise en évidence des caractères biochimiques puis antigéniques de Salmonella abortus ovis.

Sur gélose au bromocrésol pourpre, nous observons des colonies naines, lactose - , sur lesquelles sont effectuées :

- une coloration de Gram : ce sont de petits bacilles gram -
- une recherche de cytochrome oxydase : négative
- une recherche de catalase : positive.

Dans un deuxième temps, nous ensemençons une galerie avec les milieux suivants :

- une gélose profonde
- deux milieux de Hugh et Leifson
- une gélose nitrate
- un milieu de Klieger
- une gélose mobilité
- une gélose citrate
- un milieu urée indole.

Après une incubation à 37° C pendant 24 ou 48 heures, nous lisons les résultats suivants :

- aérobie-anaérobie facultatif
- gazogène
- réduction des nitrates
- lactose -
- glucose +
- H₂S +
- réaction de Voges Proskauer -
- mobilité +
- β galactosidase -
- citrate +
- uréase -
- indole -
- lysine décarboxylase +
- acétoïne +
- mannitol +

Ces différentes caractéristiques permettent de conclure qu'il s'agit d'une bactérie du genre Salmonella.

Le diagnostic d'espèce est alors effectué pour chaque souche par sérotypage ; rappelons la formule antigénique de Salmonella abortus ovis :

Groupe B

Antigène O : 1, 4, 12, 27.

Antigène H : phase 1 : C
phase 2 : 1, 6

Les essais d'obtention de mutants ne débuteront que lorsque nous aurons sélectionné des souches sauvages pures, parfaitement étiquetées, poussant bien.

1.2. Milieu

L'ensemble des manipulations utilise un milieu de culture non spécifique mais permettant un bon développement de Salmonella abortus ovis : c'est la gélose trypticase soja.

La formule de la base déshydratée, commercialisée par le laboratoire BIO Mérieux est :

Hydrolysats tryptique de caséine	: 15 g
peptone de soja	: 5 g
chlorure de sodium	: 5 g
agar	: 15 g
eau distillée	: 1 000 ml
pH	: 7,3

Une fois préparé, le milieu est stérilisé 15 minutes à 121° C.

Les différentes cultures se feront sur des boîtes de Pétri contenant 20 ml de gélose.

1.3. Antibiotique

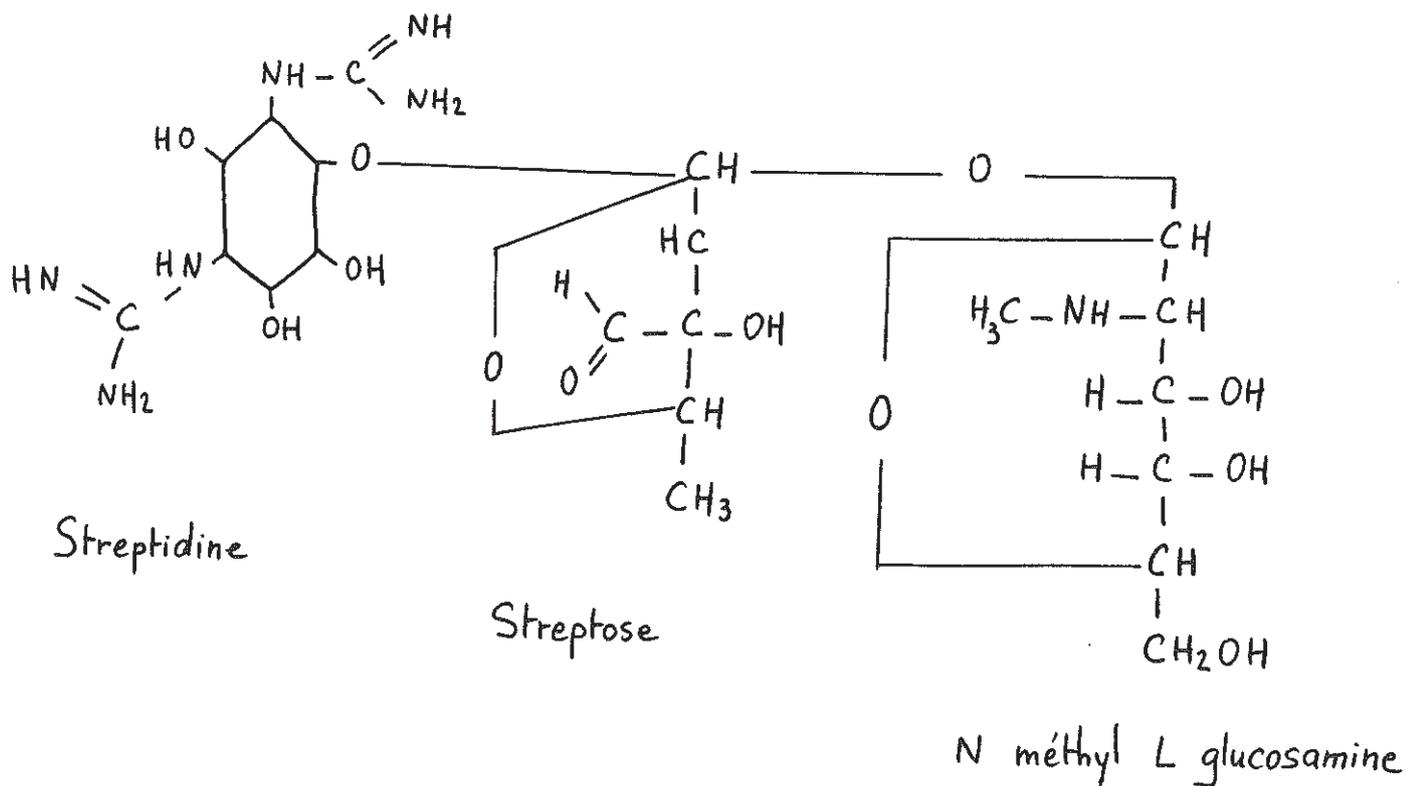
1.3.1. Généralités sur la streptomycine

* c'est un antibiotique de la famille des Aminosides, qui a été découvert en 1944 (elle a été extraite de Streptomyces griseus).

* sa structure :

Elle appartient aux antibiotiques de nature osidique. C'est une base tertiaire formée de trois glycosides :

- la streptidine
- la streptose
- la N méthyl L glucosamine



FORMULE DEVELOPPEE DE LA STREPTOMYCINE

Son sel, le sulfate de streptomycine, est inscrit à la Pharmacopée Française.

* Sa préparation :

La streptomycine est préparée par cultures en profondeur en milieu aérobie, de Streptomyces griseus (Streptomyces bikiniensis est également utilisé). Nous travaillons sur milieu nutritif à base de glucose.

L'antibiotique est ensuite récolté par adsorption sur résines échangeuses d'ions.

* Son action :

Elle a un caractère basique et un pH optimum d'activité situé en milieu alcalin soit entre 7,5 et 8.

Son spectre d'action couvre l'ensemble des bacilles gram - et les staphylocoques.

La streptomycine a une action bactéricide : en se fixant au niveau des ribosomes 30 S des germes, elle perturbe la synthèse protéique et entraîne la mort des bactéries. En outre, elle modifie la perméabilité membranaire et la respiration bactérienne ; elle agit aussi au niveau de l'ADN. Cet antibiotique n'est actif que sur les germes extra-cellulaires.

1.3.2. Critères de choix

Pourquoi utilise-t-on la streptomycine comme instigateur de la mutation, et dans quelles conditions ?

Notre but est d'obtenir facilement des mutants stables génétiquement.

1.3.2.1. Obtention facile de mutants

Les aminosides en général, la streptomycine plus particulièrement se caractérisent par l'apparition rapide de phénomènes de résistance.

La streptomycine a d'ailleurs été déjà beaucoup utilisée pour diminuer la virulence des bactéries.

1.3.2.2. Obtention de mutants

stables génétiquement

Dans l'état actuel de nos connaissances, il existe deux mécanismes de résistance aux antibiotiques :

* Résistance plasmidique

Elle est de nature extrachromosomique. Elle est très importante en clinique, puisque responsable de 85 à 90 % des résistances aux antibiotiques apparaissant in vivo.

Les plasmides, molécules d'ADN bicaténaire, de taille variable, de structure superenroulée se trouvent, à l'état autonome, dans le cytoplasme des bactéries. Ils sont capables de se répliquer indépendamment du chromosome bactérien. Ils sont transférés d'une bactérie à une autre par des phénomènes de conjugaison ou de transduction chez les salmonelles (gram -). Les plasmides ne sont pas tous stables et peuvent être éliminés des bactéries, soit spontanément, soit après action de différents agents chimiques.

Les plasmides gouvernant la résistance aux antibiotiques sont appelés "facteurs de résistance" ou encore "facteurs R".

En présence de streptomycine, certaines salmonelles vont muter et devenir résistantes à l'antibiotique par ce mécanisme, mais elles seront instables et donc non intéressantes pour notre étude (en outre, elles sont très nombreuses).

* Résistance chromosomique

Elle est obtenue par mutation. Reprenons la définition d'une mutation établie en 1901 par De Vries : "la mutation est une modification détectable et héréditaire du matériel génétique, qui n'est pas causée par ségrégation ou recombinaison génétique".

Toute mutation est définie par cinq principaux caractères :

- La rareté :

elle est appréciée par le taux de mutation c'est-à-dire la probabilité qu'a une mutation d'apparaître dans une bactérie, dans un intervalle de temps compris entre deux divisions. C'est une constante de la souche : elle est en général comprise entre 10^{-6} et 10^{-10} .

Selon le caractère muté, la proportion des mutants dans une population bactérienne est de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-10} .

- La spontanéité :

c'est le caractère le plus important de la mutation : elle se produit en dehors de l'agent sélecteur (streptomycine), elle est spontanée et non induite (mise en évidence de cette spontanéité par la méthode des répliques de Ledelberg).

- La stabilité :

le caractère muté (résistance à la streptomycine) est héréditaire : il est transmis de génération en génération, à toutes les cellules filles. Autrement dit, la bactérie mutante est génétiquement stable.

Cependant, une mutation réverse est possible : nous observons un "retour à l'état initial", le taux de ces réversions est compris entre 10^{-8} et 10^{-10} .

- La discontinuité :

la résistance à un antibiotique, résultat d'une mutation peut être d'emblée maximum, ou bien augmenter progressivement :

. résistance en un échelon : une seule mutation est capable de porter la CMI de la salmonelle à un niveau très élevé.

. résistance à multiples échelons : la résistance maximum n'est pas obtenue d'emblée, mais nous assistons au contraire à une augmentation progressive de celle-ci.

- La spécificité et l'indépendance

. chaque mutation concerne un caractère déterminé et n'a aucun effet sur les caractères dépendants d'autre mutation.

. la probabilité d'observer une mutation pour un caractère donné n'est en rien modifiée chez une bactérie ayant subi une mutation pour un autre caractère.

L'étude parallèle de ces deux mécanismes de résistance aux antibiotiques justifie que le seul moyen d'obtenir des mutants de Salmonella abortus ovis streptomycino-résistants génétiquement stables est d'avoir une mutation chromosomique. La concentration en antibiotique dans le milieu prend donc ici toute son importance : il faut empêcher les résistances plasmidiques, mais permettre une résistance chromosomique.

La résistance des salmonelles à la streptomycine se traduit biochimiquement de deux manières différentes :

- inactivation et destruction de l'antibiotique. Trois groupes d'enzymes ont été mis en évidence : les acétylases, les adénylases et les phosphorylases.

- tolérance de l'antibiotique, par modification du site d'action au niveau des ribosomes pour ce qui est de la streptomycine.

Cette tolérance peut parfois aller jusqu'à la dépendance du germe vis-à-vis de l'antibiotique : à ce moment, celui-ci ne peut plus pousser que dans un milieu contenant l'antibiotique.

1.3.3. Concentrations choisies

Des travaux antérieurs nous apprennent que des concentrations élevées en streptomycine c'est-à-dire concentrations où l'antibiotique est bactéricide, ne permettent que le développement de mutants chromosomiques. Pour obtenir notre mutant, nous allons donc préparer des milieux à fortes teneurs en streptomycine.

Pour les primocultures, nous utiliserons les concentrations en antibiotique suivantes :

50 - 75 - 100 - 200 - 300 - 400 - 500 mcg par ml.

Pour les cultures suivantes, la mutation devant être obtenue par étapes successives sur des milieux à teneur croissante en streptomycine, nous utiliserons les concentrations suivantes :

600 - 700 - 800 - 900 - 1 000 - 1 100 - 1 200 - 1 300 - 1 400 -
1 500 - 1 600 mcg par ml.

2) Obtention de mutants streptomycino-dépendants

Le travail se fait en deux étapes :

- dans un premier temps, nous devons isoler des mutants streptomycino-résistants.

- dans un deuxième temps, nous sélectionnerons des mutants streptomycino-dépendants.

2.1. Obtention de mutants streptomycino-résistants

- Les souches sauvages, parfaitement pures que nous avons sélectionnées pour notre recherche sont mises en culture en bouillons nutritifs. Nous laissons alors incuber 18 heures à l'étuve à 37 ° C.

- Coulons sept boîtes de Pétri par souche avec la gélose trypticase soja contenant des concentrations croissantes de streptomycine (50, 75, 100, 300, 400, 500 mcg par ml).

- Nous ensemençons alors en surface ces boîtes avec 0,05 ml de la suspension bactérienne de 18 heures préparée et nous portons à l'étuve à 37 ° C.

Rappelons que nous savons qu'à ces concentrations d'antibiotique les colonies qui se développeront seront des mutants génétiquement stables.

- Parallèlement, nous effectuons (pour chaque souche) le dénombrement de la suspension bactérienne du départ ; nous utilisons la technique des dilutions dans de l'eau physiologique.

Nous déterminerons ainsi que les teneurs en germes variaient, selon la souche sauvage considérée, entre 2.10^8 et 8.10^8 germes par ml.

- à partir de 24 heures d'incubation, les différentes boîtes sont observées matin et soir, à la recherche d'éventuelles colonies qui seraient des mutants streptomycino-résistants. Indépendamment de la concentration en streptomycine du milieu, il faudra 3 à 6 jours pour avoir des colonies résistantes. Selon les boîtes, le nombre des colonies varie entre 5 et 100 environ ; le taux de mutation est donc compris entre 10^{-6} et 10^{-8} .

2.2. Sélection de mutants streptomycino-dépendants

En s'inspirant de ce qui a été fait pour les brucelles, comme dans les travaux d'Elberg, nous allons parmi tous ces mutants streptomycino-résistants, sélectionner les colonies streptomycino-dépendantes.

Nous utilisons la technique des répliques sur milieu sans antibiotique. Ainsi, chaque colonie qui a poussé sur les milieux avec streptomycine est repérée précisément par un symbole, puis repiquée sur une gélose exempte d'antibiotique. Par ces manipulations, nous allons pouvoir mettre en évidence le caractère de "dépendance" : en effet, les mutants streptomycino-dépendants seront incapables de se développer sur un milieu sans streptomycine. Ainsi, en comparant ces cultures aux précédentes, en présence d'antibiotique, nous pouvons identifier les mutants streptomycino-dépendants.

Ces colonies ainsi sélectionnées sont alors remises en culture :

- sur une gélose contenant de la streptomycine à la concentration pour laquelle une mutation a été observée.
- sur des géloses contenant la streptomycine à des concentrations supérieures.

L'incubation à l'étuve à 37 ° C est alors maintenue jusqu'à ce que nous ayons des cultures suffisantes.

3) Obtention de mutants réverses

En concernant le raisonnement suivi par Herzberg et Elberg sur les brucelles, nous avons cherché à obtenir des mutants réverses de ces souches streptomycino-dépendantes.

Ainsi, les différentes colonies choisies streptomycino-dépendantes sont ensemencées sur une gélose trypticase soja sans streptomycine. Les bactéries qui se développent dans ces conditions sont donc des mutants des souches streptomycino-dépendantes. On parle de mutants réverses (attention, il ne faut pas les confondre avec les souches sauvages initiales).

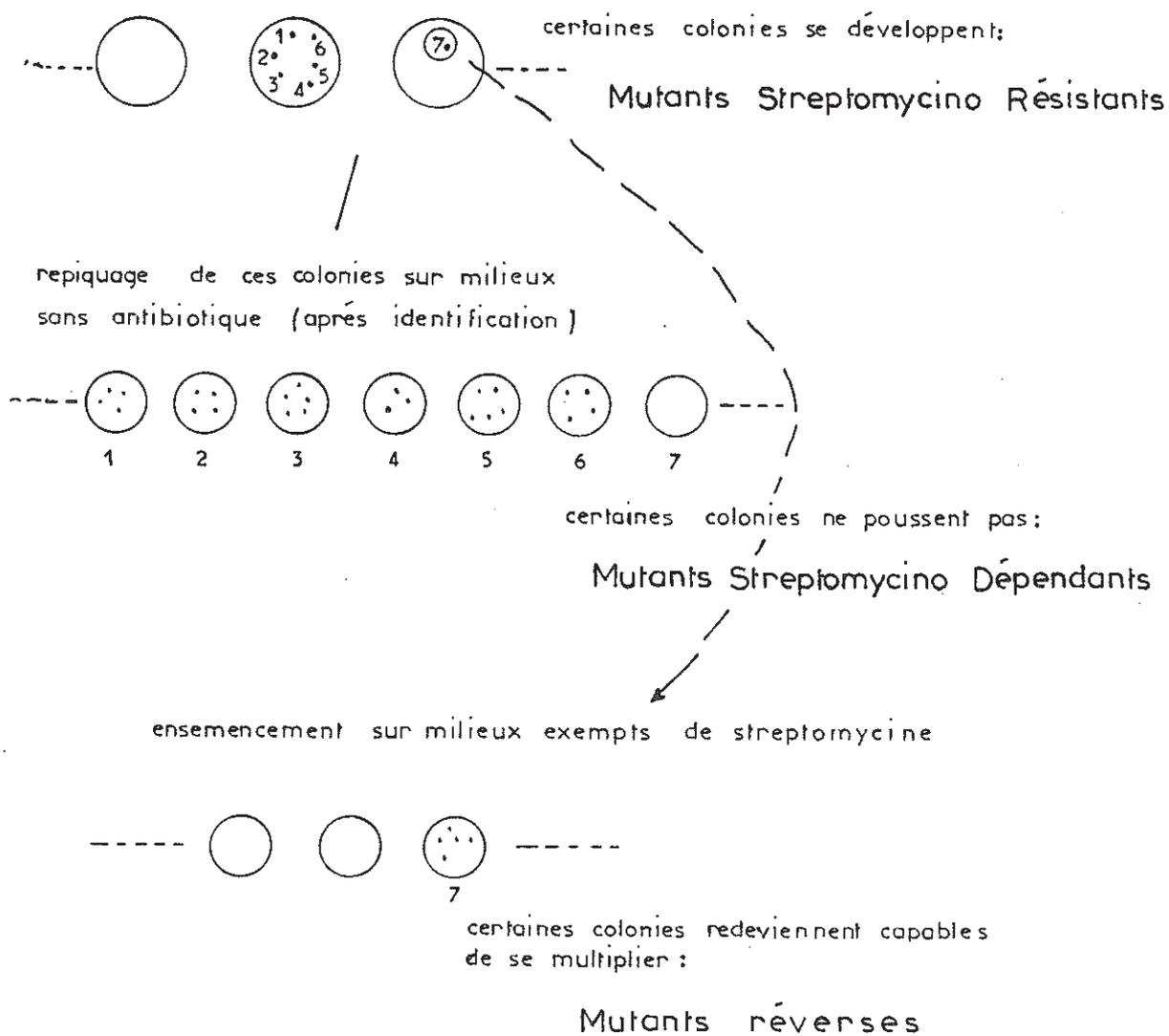
Ces souches réverses sont isolées et cultivées sur milieu simple (trypticase soja) sans antibiotique.

Foetus , Utérus , Placenta , Ecoulements vaginaux

↓
SOUCHES SAUVAGES PURES DE S.A.O.

↓
mise en culture sur bouillons nutritifs pendant 18h à 37°C

↓
ensemencement de géloses trypticase soja contenant des concentrations croissantes de streptomycine



SCHEMA 1 : Représentation schématique de la technique suivie pour isoler un mutant réverse de S A O

3 ième Partie :

**LES CARACTERISTIQUES
DE LA SOUCHE VACCINALE**

Ces recherches précédemment décrites ont conduit à l'isolement de plusieurs souches reverses. Une série d'expérimentations menées in vivo au Laboratoire de Limoges ont permis de sélectionner un de ces mutants intéressant pour la mise au point d'un vaccin. Nous présenterons par la suite à travers cette souche les caractères biochimiques des mutants réverses.

A) CARACTERES ETUDIES IN VIVO

L'expérimentation a été menée classiquement, c'est-à-dire :

- dans un premier temps sur un animal de laboratoire (non spécifique) : la souris.
- dans un deuxième temps sur l'hôte spécifique de Salmonella abortus ovis : le mouton.

1) Chez la souris

Le but de cette étude est triple :

- apprécier la virulence résiduelle du mutant reverse,
- évaluer le degré de protection procuré à l'animal,
- mettre en évidence la stabilité de la souche.

Ce travail est effectué sur les différentes souches reverses isolées précédemment. Nous utiliserons également les souches sauvages correspondantes.

1.1. Virulence résiduelle

Pour chaque mutant reverse choisi et chaque souche sauvage correspondante, il a fallu préparer avec minutie des inoculums de titre précisément défini. Ces inoculums ont ensuite été administrés à différents lots de souris femelles Swiss identiques, de telle sorte que chaque souris reçoive le même nombre de germes soit entre 1.10^7 et 4.10^7 dans l'expérimentation menée par Brugère (3).

La virulence est alors appréciée par le taux de mortalité dans chaque lot

- nous constatons sans surprise que les souches sauvages donnent des taux de mortalité de 100 %

- d'autre part, certaines souches réverses donnent un taux de mortalité nu

Remarque : Dans les travaux de Brugère, une des souches donne des résultats surprenants (27757) : la souche sauvage ne provoque la mort que de 40 % des animaux. Par contre, les deux souches réverses qui en sont issues donnent respectivement des taux de mortalité de 80 et 100 %. Ces résultats ne semblent pas expliqués de façon absolue:

- soit le résultat est faussé par la taille du lot d' animaux,

- soit il y a atténuation de la virulence de la souche sauvage au cours de l'expérimentation in vitro, mais exacerbation de cette virulence par le biais des mutations.

A l'issue de cette première étude, nous avons donc à notre disposition différentes souches réverses de virulence atténuée (puisque nulle) sur la souris. Les expérimentations ultérieures ne seront faites que sur ces souches-là.

1.2. Degré de protection

Le principe de cette étude est de comparer l'effet pathogène d'une souche sauvage virulente de Salmonella abortus ovis sur des souris neuves et sur des "souris ayant été vaccinées" par un mutant réverse (3, 5, 8, 43).

Nous inoculons avec chaque souche réverse un lot de 10 souris femelles Swiss, l'inoculation est faite en intrapéritonéale, avec des quantités de germe du même ordre de grandeur.

La dose d'épreuve virulente est administrée quatre semaines après (les souches utilisées sont les souches sauvages correspondantes dont nous avons montré la virulence dans l'expérience précédemment décrite).

Que constate-t-on ?

- la mort de toutes les souris neuves,
- la survie de tous les animaux ayant eu une inoculation par une souche réverse.

Nous avons fait une autopsie comparée de souris témoins, tuées par la dose d'épreuve et de souris ayant été inoculées par la souche réverse, après sacrifice.

Chez les premières, nous observons des organes congestionnés, avec de nombreuses lésions tissulaires. Par contre, les souris inoculées avec les germes mutants réverses ne présentent aucune lésion organique. Il semble que les germes vivants n'aient pas pu diffuser dans l'organisme et aient été détruits rapidement.

Nous pouvons donc conclure que les souches réverses procurent une protection significative à la souris contre une infection à Salmonella abortus ovis.

1.3. Stabilité

Après passages successifs sur animaux, les mutants réverses conservent-ils leurs caractères (en particulier innocuité et pouvoir protecteur) ?

Coussens (8) au Laboratoire Départemental de Limoges, s'est plus particulièrement intéressé à l'étude de ce caractère des mutants réverses (SAO 24337 1400 Rv).

L'expérimentation consiste à inoculer un lot de souris Swiss femelles avec la souche étudiée ; trois jours plus tard, les animaux sont sacrifiés, leurs rates prélevées, broyées et ensemencées pour dénombrement. A partir de la plus grosse rate, il a préparé l'inoculum qui servira au deuxième passage sur souris. Dix passages seront ainsi effectués, au niveau de chacun desquels il étudiera les différents caractères de la souche.

Cette expérimentation met en évidence la stabilité tant des caractères biochimiques que cultureux de la souche réverse. Nous constatons qu'après passages successifs sur souris, la souche reste de virulence atténuée.

Les résultats de ces différentes expérimentations, recherche de la virulence résiduelle, évaluation du degré de protection, et enfin étude de la stabilité des caractères, ont conduit l'équipe de Nicolas à étudier plus particulièrement chez l'ovin la souche SAO 24337 1400 Rv.

2) Chez l'ovin : Hôte spécifique de Salmonella abortus ovis

Les différentes études menées à Limoges sur ovins testent les caractères de la souche SAO 24337 1400 Rv. A l'issue des travaux effectués sur souris, nous avons constaté :

- que la souche sauvage 24337 entraînait 100 % de mortalité,
- que le mutant 24337 1400 Rv induisait 0 % de mortalité,
- qu'après "vaccination" avec cette souche et inoculation d'une dose d'épreuve de salmonelles virulentes, on notait 0 % de mortalité parmi les souris femelles Swiss utilisées pour l'expérimentation,
- et qu'enfin, SAO 24337 1400 Rv présentait des caractères de stabilité chez cet animal de laboratoire.

Ainsi, le Laboratoire Départemental de Limoges a, dans un deuxième temps, étudié cette souche chez l'hôte spécifique de Salmonella abortus ovis qu'est le mouton.

Trois principaux caractères vont être explorés :

- le pouvoir immunogène de la souche,
- l'absence de virulence,
- la stabilité.

2.1. Pouvoir immunogène

Les travaux menés par Brugère (Limoges, 1984) mettent en évidence les caractères in vivo de la souche réverse (SAO 24337 1400 Rv).

Il a défini plusieurs lots d'animaux :

- . agnelles,
- . brebis vides,
- . brebis en cours de gestation,
- . brebis vides témoins,
- . béliers témoins.

Le profil sérologique de chaque animal dans chaque lot a été déterminé avant le début de l'expérimentation : ils sont tous sérologiquement négatifs.

L'étude est alors menée en 3 étapes :

- "vaccination" par voie orale des animaux,
- insémination un mois après de toutes les femelles,
- administration d'une dose d'épreuve d'une souche virulente à deux mois et demi de gestation.

Pendant toute la durée de l'expérimentation, sont effectués :

- un suivi clinique des animaux dans les jours qui suivent la dose d'épreuve, avec recherche d'excrétion éventuelle de salmonelles,
- un suivi sérologique régulier pendant toute la durée de gestation.

Nous constatons que seuls les animaux vaccinés et, tous les animaux vaccinés, terminent leur gestation normalement, et donnent ainsi naissance à des agneaux viables.

L'administration de la souche mutante réverse a donc protégé les animaux contre l'infection salmonellique. Nous mettons donc ainsi en évidence le pouvoir immunogène certain de cette souche.

Pourtant, l'étude de la cinétique des anticorps montre une élévation peu importante de ceux-ci, ainsi qu'un retour à une valeur non significative rapide (environ 10 semaines). L'expérimentation a complété ce résultat en montrant que la souche n'était pas auto-agglutinable (ni en eau physiologique, ni en acriflavine). Cette évolution sérologique semble être liée à la voie d'inoculation ; la voie sous-cutanée entraînerait, elle, une élévation rapide, importante et durable des anticorps ; des résultats analogues ont été obtenus par Coussens, avec la voie conjonctivale (8).

Notons l'intérêt de la voie orale qui facilitera un diagnostic sérologique dans un troupeau infecté. On pourra, en effet, difficilement confondre un animal vacciné et un animal infecté dont le taux d'Ac est beaucoup plus élevé. Ainsi, en plus de la vaccination, le dépistage sérologique et l'élimination des porteurs sains peuvent être faits.

2.2. Innocuité sur brebis gestantes

L'expérimentation précédente conduit non seulement à la mise en évidence du pouvoir immunogène de la souche mais aussi à celle de son innocuité.

La non virulence de la souche mutante réverse est prouvée par la fin de la gestation et la mise-bas normales des brebis vaccinées en cours de gestation (les plus sensibles à Salmonella abortus ovis).

Indépendamment de cette étude d'innocuité (sur un lot d'animaux de laboratoire) conduite et publiée par Coussens (8) et Brugère (3), d'autres expérimentations effectuées sur le terrain par Nicolas mettent en évidence l'innocuité de cette souche réverse sur femelles gestantes. Ces résultats n'ont pas fait l'objet de publication.

2.3. Stabilité

La recherche de la stabilité de la souche a été faite par Coussens chez l'agneau. Le but est de montrer que la souche étudiée garde ses caractéristiques après passages successifs sur l'animal.

L'expérimentation consiste à inoculer des agneaux sérologiquement négatifs avec la souche mutante réverse. Sept jours après, les animaux sont sacrifiés, certains organes sont prélevés, broyés et ensemencés en vue d'une numération. A partir de l'organe le plus riche, un inoculum est préparé pour être administré à un deuxième lot d'animaux. Cinq passages successifs ont ainsi été effectués dans cette étude, au niveau de chacun desquels la souche a été caractérisée.

Nous avons pu constater :

- que les caractères biochimiques n'étaient pas modifiés,
- que la souche demeurait de virulence atténuée.

Concluons donc à la stabilité des caractères de la souche SAO 24337 1400 Rv.

L'ensemble de ces observations effectuées in vivo au Laboratoire de Limoges a permis de sélectionner une souche mutante réverse de Salmonella

considérable dans la mise au point d'une vaccination efficace contre la salmonellose du mouton.

En effet, nous avons pu montrer :

- qu'elle était de virulence atténuée,
- qu'elle avait un pouvoir immunogène,
- qu'elle présentait une stabilité quant à ces différents caractères.

Intéressés par la perspective de disposer d'un vaccin vivant de virulence atténuée contre la salmonellose ovine, nous avons affiné la caractérisation de cette souche et tenté de déterminer in vitro ces principaux marqueurs.

B) MARQUEURS DE LA SOUCHE SAO 24337 1400 Rv MIS EN

EVIDENCE IN VITRO

1) Caractères biochimiques

Les caractères biochimiques fondamentaux de la souche réverse, recherchés avec les galeries d'identification, sont les mêmes que ceux de la souche sauvage sauf en ce qui concerne la réaction de Voges Proskauer.

Cette réaction a pour but de mettre en évidence une voie métabolique particulière d'utilisation du glucose par les bactéries : c'est la voie du butylène glycol.

La réaction se fait en milieu de Clark et Lubs, milieu liquide, jaune, de pH égal à 7,5, contenant à parts égales des peptones, du phosphate bipotassique et du glucose.

Si les bactéries utilisent la voie du butylène glycol, il a production d'acétyl-méthylcarbinol qui, en présence d'une base (addition d'une solution de soude) est oxydé en diacétyl. Après addition d'alpha naphthol, le diacétyl en présence des peptones donne une coloration rose rouge : la réaction est positive.

Les souches sauvages de Salmonella abortus ovis donnent toujours une réaction de Voges Proskauer négative.

Par contre, la souche mutante réverse ne donne ni une réaction positive (comme Klebsiella), ni une réaction négative. Ce résultat intermédiaire permet donc de différencier notre souche d'une souche sauvage de Salmonella abortus ovis. Ce marqueur n'en demeure pas moins insuffisant : il existe toujours des risques d'erreur.

2) Caractères cultureux : temps de croissance

Dans le travail d'isolement des mutants réverses, il a été constaté que les mutations modifiaient les conditions de culture des souches mutantes et plus particulièrement le temps de croissance.

Intéressés par ce caractère différentiel entre souche mutante et souche sauvage, nous avons voulu chiffrer ces variations (5). Dans ce but, nous avons étudié le temps nécessaire après ensemencement pour obtenir des clones de 1 millimètre de diamètre. Les résultats donnés sont les suivants :

- pour les souches sauvages : environ 24 heures,
- pour les souches réverses : environ 48 heures.

Remarque : notons que pour obtenir les souches dépendantes, il faut environ 72 heures. Cette caractéristique constitue une façon relativement fiable de distinguer le mutant d'une souche sauvage.

3) Travaux de Coussens : recherche d'un marqueur
biochimique de SAO 24337 1400 Rv

Dans le cadre d'un travail mené au Laboratoire Départemental de Limoges (8), Coussens a tenté de mettre en évidence un marqueur de ce mutant réverse. Il a choisi plus particulièrement 2 pôles d'étude :

- les fermentations sucrées,
- la recherche d'enzymes.

3.1. Fermentations sucrées

Principe : Une fermentation est l'utilisation par voie anaérobie d'oses et osides conduisant à une production d'acide.

Pratiquement, nous travaillons sur des tubes en série, contenant chacun un substrat osidique différent, de concentration déterminée. Dans chaque tube est aménagée une zone d'anaérobiose.

La souche est repiquée sur gélose tryptose et mise à l'étuve à 37°C jusqu'en phase exponentielle. La surface de la gélose est alors lavée avec le réactif Api 50 CHE qui contient un indicateur coloré de pH. C'est avec cette suspension bactérienne que nous ensemençons les différentes cupules. Après mise en anaérobiose par adjonction de vaseline stérile, les milieux sont portés à incubation à 37° C.

Pour chaque sucre, la fermentation s'accompagne d'une acidification du milieu, du virage de l'indicateur et de l'apparition d'une couleur jaune.

Résultats : Cette étude comparée entre notre mutant (SAO 24337 1400 Rv) et plus de 150 autres souches sauvages n'a pas mis en évidence de différences intéressantes entre la souche réverse et les sauvages.

En effet, elle fermente :

- . le ribose,
- . le D xylose,
- . le galactose,
- . le D glucose,
- . le D fructose,
- . le D mannose,
- . le mannitol,
- . le sorbitol,
- . la N acétylglucosamine,
- . le maltose,
- . le L fucose,
- . le gluconate.

Elle présente des résultats intermédiaires pour :

- . le glycérol,
- . le dulcitol,
- . le mélibiose.

Ce travail relativement complet n'a pas permis de mettre en évidence un caractère propre à la souche réverse 24337 1400 Rv.

3.2. Recherche d'enzymes

- Par une technique biochimique colorimétrique classique, il a cherché à détecter la présence de trois enzymes, l'ornithine décarboxylase (ODC), la lysine décarboxylase (LDC), l'arginine dihydrolase (ADH).

Il a ainsi montré que notre souche mutante réverse, comme les souches sauvages étudiées en parallèle :

- possédait une lysine décarboxylase,
- était dépourvue des deux autres enzymes (ODC et ADH).

- En utilisant une technique plus récente, décrite par Richard, Coussens a recherché 3 autres enzymes dont on a prouvé l'intérêt taxonomique :

- la bétaglucuronidase
- la gammaglutamyltransférase
- la bétaxylosidase

Cette manipulation utilise des disques imprégnés d'un substrat chromogène incolore spécifique pour chaque enzyme. La présence de l'enzyme est révélée par la coloration de la suspension bactérienne en contact avec le disque.

Cette étude, une fois encore comparative entre la souche réverse et plusieurs souches sauvages de SAO, n'a pas permis de trouver un caractère spécifique à notre mutant ; en effet, SAO 24337 1400 Rv et toutes les autres souches étudiées possèdent seulement la gammaglutamyltransférase.

Ainsi, ces travaux, bien que très intéressants, n'ont pas permis de déterminer un bon marqueur de la souche mutante SAO 24337 1400 Rv.

Cependant, pour que cette souche, dont nous avons souligné l'intérêt, puisse être utilisée aussi bien dans des expérimentations au laboratoire que sur le terrain comme vaccin, il est impératif qu'elle puisse être parfaitement reconnue. Aussi, différentes recherches ont-elles été menées nous permettant d'identifier de façon certaine la souche 24337 1400 Rv par un marqueur épidémiologique. (Ces dernières recherches n'ont pas été publiées).

C) RESUME DES CARACTERISTIQUES DE LA SOUCHE MUTANTE
REVERSE SAO 24337 1400 Rv : SA FICHE D'IDENTITE

- Souche sauvage d'origine : 24337.
- C'est un mutant réverse issu d'une souche streptomycino-dépendante obtenue sur un milieu contenant 1400 mcg de streptomycine par ml.
- Elle a tous les caractères biochimiques d'une SAO sauvage sauf un : elle donne une réaction de Voges Proskauer intermédiaire, c'est-à-dire ni franchement négative (comme la souche sauvage), ni franchement positive.
- Temps de croissance : 48 heures.
- Elle est stable génétiquement.
- Nous avons mis en évidence sur l'hôte spécifique de Salmonella abortus ovis :
 - * un pouvoir immunogène,
 - * l'absence de virulence.

4 ième partie :

**CINETIQUE DU
VIEILLISSEMENT
DE LA SOUCHE**

Encouragés par les résultats prometteurs de cette souche réverse pour une prophylaxie médicale efficace de la salmonellose ovine, le Professeur Nicolas nous a proposé d'étudier plus particulièrement la forme et les caractéristiques de cette souche en vue de la fabrication d'un vaccin.

Après avoir présenté la forme galénique sous laquelle la souche a été préparée, nous étudierons précisément le vieillissement de SAO 24337 1400 Rv sous cette forme.

A) LYOPHILISATION DE LA SOUCHE

1) Principe de la lyophilisation

La lyophilisation est une technique de dessiccation par sublimation d'un liquide préalablement congelé. La solution initiale est, par ce procédé, transformée en un résidu solide, très poreux, appelé lyophilisat.

Une lyophilisation se fait en 3 temps élémentaires :

- congélation,
- dessiccation primaire ou sublimation,
- dessiccation secondaire destinée à éliminer les

dernières traces d'eau.

Chacune de ces étapes est fonction des variations parfaitement contrôlées des différents paramètres physiques, la pression et la température.

La congélation :

Elle consiste à refroidir le produit initial pour le transformer en solide (l'eau que la lyophilisation a pour but d'extraire se trouve donc à l'état de glace).

Deux facteurs doivent être particulièrement pris en compte :

- la température de congélation,
- la vitesse d'abaissement de la température.

La température de congélation dépend de la nature des composants du produit à lyophiliser. La température doit être inférieure à la température de solidification totale du produit (le composant se solidifiant à la température la plus basse sera ainsi bien congelé).

De la vitesse de congélation dépend la qualité du lyophilisat. En effet, pour la plupart des produits, une congélation trop lente conduit à la formation de gros cristaux, responsables de la détérioration des cellules fragiles.

On préférera le plus souvent une congélation à basse température mais faite le plus rapidement possible. Le produit obtenu aura une meilleure porosité et donc une plus grande surface de réhydratation interne : il sera de meilleure qualité et sa conservation sera facilitée.

La sublimation :

C'est la première partie de la deshydratation, elle correspond à l'élimination de l'eau libre. Elle consiste en une transformation de l'eau à l'état de glace en vapeur sans passage par la forme liquide.

Le produit congelé est placé dans une enceinte sous vide : l'abaissement de la pression en dessous du point triple de l'eau déclenche la sublimation. Cette différence de pressions constitue "le moteur de la lyophilisation" (schéma 2).

Lors de cette sublimation, le produit traité a tendance à se refroidir, alors que l'eau piégée sous forme de solide a tendance à se réchauffer. Un équilibre entre ces deux températures stopperait la lyophilisation. Les produits à lyophiliser sont donc placés dans une zone chauffante et le piège de la vapeur d'eau en zone réfrigérée (schéma 3).

La dessiccation secondaire (= désorption)

Elle est destinée à éliminer l'eau liée, c'est la deuxième partie de la déshydratation.

Dès la disparition des derniers cristaux de glace, la température du produit croît très rapidement. Elle sera maintenue volontairement à une valeur maximale tolérée par le produit pour éliminer cette eau résiduelle.

Lors d'une opération de lyophilisation, la régulation de la dépression peut-être faite par différents systèmes : tube à décharge, jauge de Pirani ou jauge de Mac Leone.

Le contrôle de la température utilise des sondes thermoélectriques. Notons que cette mesure devra être faite sur les plateaux chauffants, au niveau du condensateur de vapeur d'eau mais également dans un flacon témoin.

2) Matériel

Maintenant que nous avons compris le principe théorique d'une lyophilisation, décrivons les différents éléments composant un lyophilisateur de laboratoire (que nous avons utilisé dans cette expérimentation).

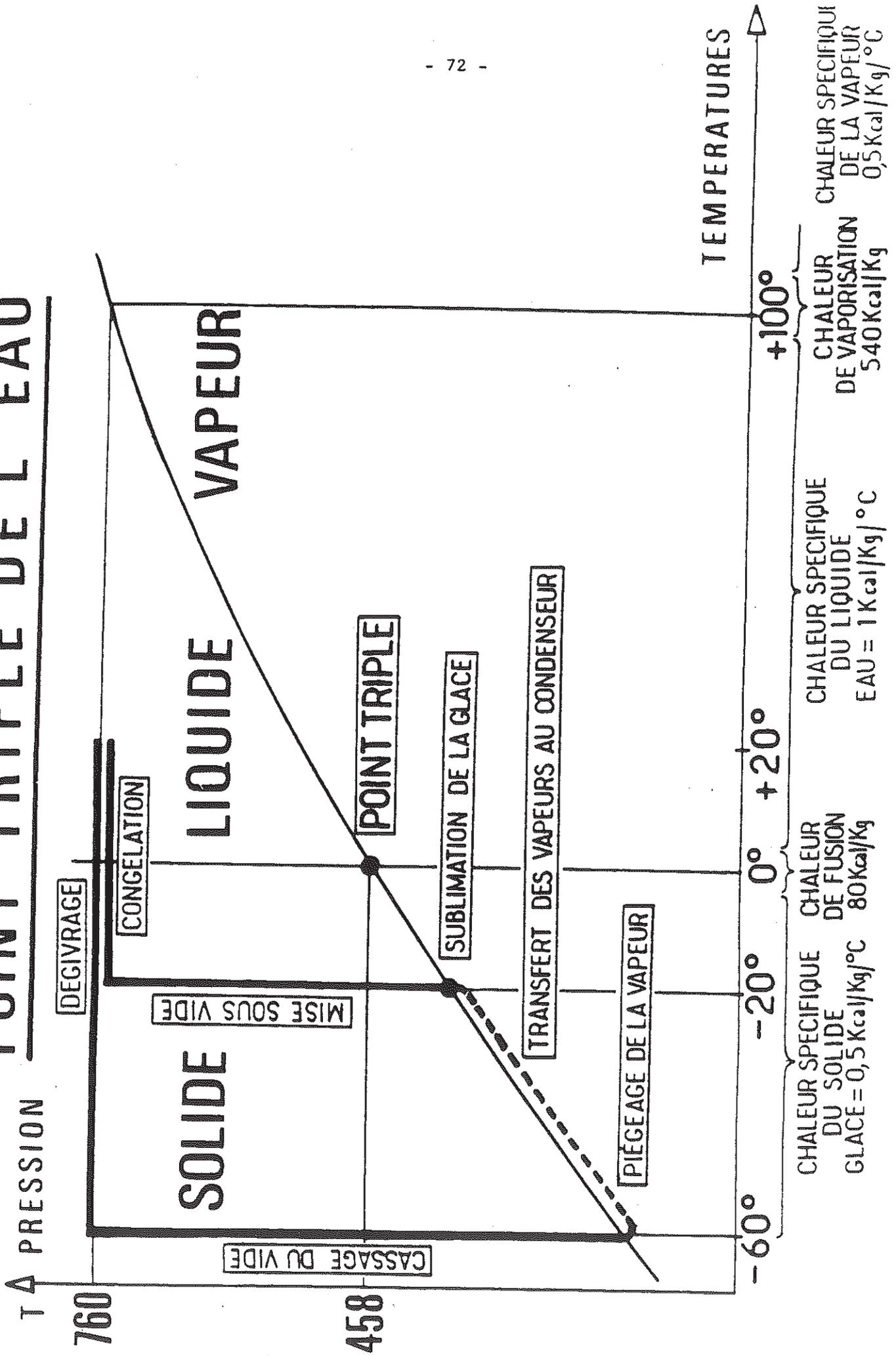
Les produits à lyophiliser sont conditionnés en flacons que l'on dépose sur des plaques chauffantes, lesquelles leur transfèrent la chaleur nécessaire à la sublimation.

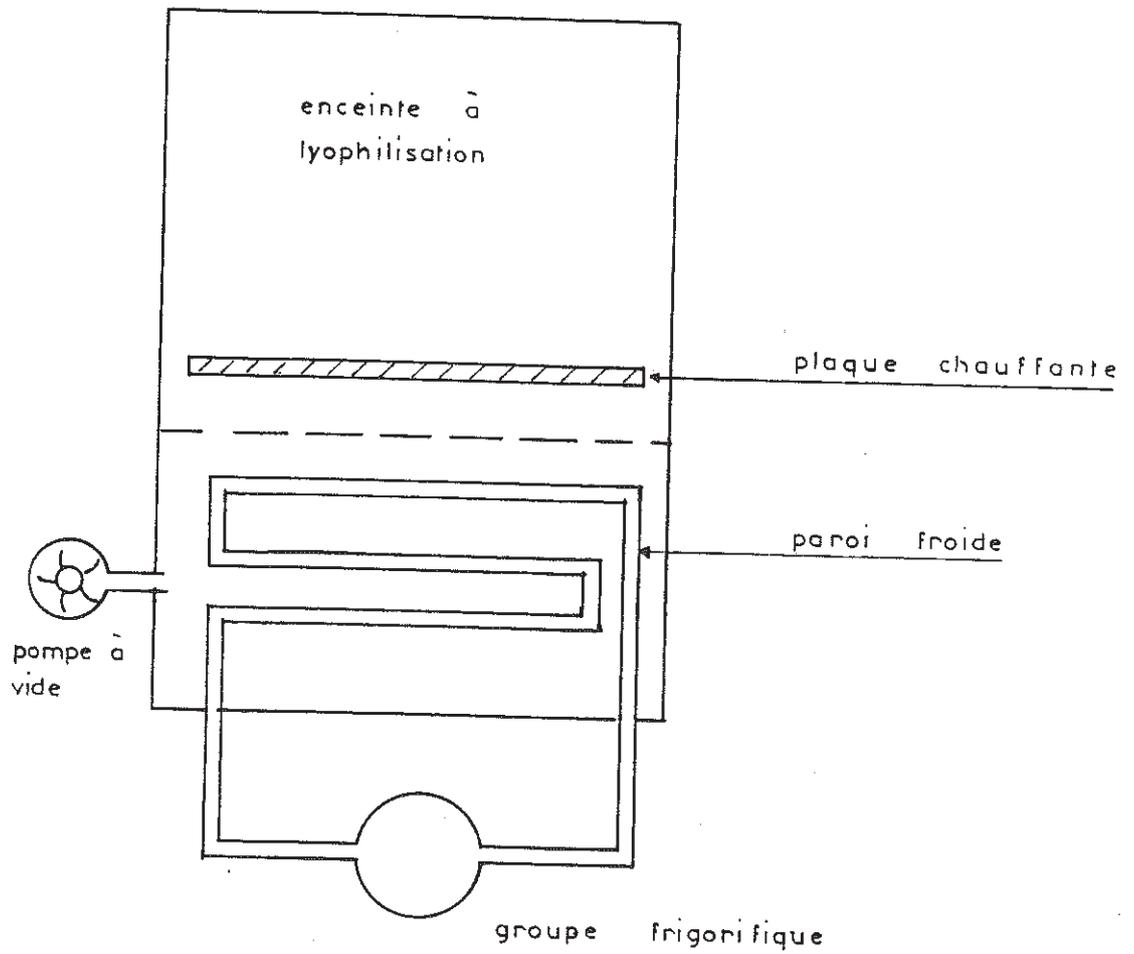
On isole cet ensemble, simplement mais sûrement, avec une cloche parfaitement jointe au support ; il ne doit, en effet, y avoir aucun échange avec l'air.

Le vide est effectué à l'aide d'une pompe à vide, contrôlé par une jauge de Pirani par exemple.

Les vapeurs de liquide émises sont condensées dans une zone réfrigérée appelée piège.

POINT TRIPLE DE L'EAU





SCHEMA 3 : Schéma d'un lyophilisateur

3) Protocole suivi au laboratoire

Nous nous proposons, dans ce paragraphe, de présenter succinctement les différentes étapes du mode opératoire utilisé pour lyophiliser la souche réverse que nous étudions SAO 24337 1400 Rv.

* La souche isolée et parfaitement identifiée est repiquée sur gélose ordinaire trypticase soja jusqu'à l'obtention d'une culture très abondante.

* Préparation du milieu de lyophilisation : la formule du milieu choisi est la suivante :

Peptone pancréatique de caséine (Biokar Réf. 104 003)	25 grammes
Glutamate de Sodium (Prolabo Réf. 2787 2298)	10 grammes
Saccharose (Prolabo Réf. 2747 8296)	50 grammes
Eau q.s.p.	1000 ml

- pH = 6,70

- stérilisation par filtration.

* Nous recueillons, avec un simple écouvillon, l'ensemble des colonies qui sont mises en suspension dans le milieu de lyophilisation. La préparation obtenue doit être homogène et très dense, la lyophilisation détruisant une partie des germes.

* La suspension est répartie directement dans les flacons qui serviront au conditionnement, à raison de 2 ml par flacon. Nous utilisons des flacons type pénicilline dont le système de fermeture est un bouchon en caoutchouc cannelé permettant le passage des vapeurs pendant la lyophilisation. Ce bouchon est, après le remplissage, simplement posé sur le flacon.

* Les flacons sont alors congelés. Nous utilisons un congélateur simple ; la congélation se fait à - 35 ° C et dure 12 heures environ.

* Lyophilisation proprement dite ou sublimation.

* Bouchage des flacons. Il est effectué immédiatement après la dessiccation, dans l'enceinte même de la cuve de lyophilisation. Nous évitons ainsi tout contact du produit avec l'air ambiant, le protégeant d'une réhumidification, mais aussi d'une contamination éventuelle.

* Les flacons sont ensuite capsulés avec des capsules métalliques puis sertis.

4) Caractéristiques d'un produit lyophilisé - Modalités de conservation

La lyophilisation a actuellement de multiples applications.

Elle permet en particulier de conserver vivants des tissus vivants comme les bactéries, mais également de conserver dans de bonnes conditions des substances fragiles en solution aqueuse.

Cette technique constitue donc un excellent moyen de conservation des vaccins.

Une fois lyophilisé, le produit conserve sa structure originelle et ses propriétés physiques, chimiques et biologiques.

Très finement poreux, il se réhydrate facilement par addition du solvant au moment de l'utilisation.

La durée de conservation variera en fonction de la nature du produit lyophilisé et de la qualité de la lyophilisation.

Les vaccins vivants lyophilisés sont conservés à l'abri de la lumière, en chambre froide à + 4 ° C.

Aussi, nous allons étudier la cinétique du vieillissement de la souche mutante réverse de SAO 24337 1400 Rv après lyophilisation

conservation en flacons verre teinté à + 4 ° C.

B) LA CINÉTIQUE DU VIEILLISSEMENT D'UN VACCIN VIVANT

LYOPHILISE

1) Buts de l'expérimentation

Dans l'objectif de disposer d'un vaccin efficace, commercialisable, indiqué dans la prophylaxie de la salmonellose ovine, les différentes expérimentations menées s'inscrivent obligatoirement dans l'ensemble des techniques de contrôle du produit. Notre travail consiste à définir l'influence de différents paramètres sur le titre du vaccin. Ainsi, nous étudierons plus particulièrement l'importance :

- de la durée de conservation,
- de la nature du solvant de reprise,
- du temps de contact avec le solvant ; nous serons amenés à nous demander s'il n'existe pas une corrélation entre ce temps de contact et la température à laquelle est faite la manipulation.

La finalité du raisonnement est donc de mettre en évidence que la souche mutante lyophilisée peut avoir un usage vaccinal :

- nous voulons donc montrer qu'elle vieillit bien, c'est-à-dire qu'après lyophilisation, les bactéries ne meurent pas dans des proportions non contrôlables.
- nous devons déterminer les conditions optimales d'utilisation.

2) Etude de l'influence de la durée de conservation sur le titre avec une reprise en eau physiologique tamponnée ou avec un solvant coloré

Le principe de l'expérimentation est le titrage par dénombrement sur gélose d'un lot de vaccin à différents moments de sa conservation.

2.1. Matériel

2.1.1. Le matériel proprement dit

Nous disposons pour cette partie de l'expérimentation de matériel classique de bactériologie :

- tubes à essais stériles : ce sont des tubes en verre, dotés d'un bouchon à vis assurant une fermeture efficace car nous travaillons stérilement.

- boîtes de Pétri classiques dans lesquelles sera réparti le milieu pour dénombrement.

- pipettes Pasteur stériles destinées aux étalements.

- pipettes stériles à usage unique de 1 ml.

- pipettes stérilisées en verre de 10 ml.

- agitateur mécanique type Vortex.

2.1.2. Le vaccin

Nous décidons de faire la recherche sur un ensemble de trois flacons de vaccins (pour chaque solvant et pour chaque dénombrement) issus d'un même lot de fabrication, conservés dans les mêmes conditions, à l'abri de la lumière, en chambre froide à + 4° C.

2.1.3. Les milieux

2.1.3.1. Milieux de reprise du lyophilisat

* eau physiologique tamponnée

- formule :	Phosphate disodique ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4$)	1 g
	Phosphate monopotassique ($\text{KH}_2 \text{PO}_4$)	0,2 g
	Chlorure de sodium (NaCl)	9 g
	Eau distillée	1000 ml

- l'eau physiologique tamponnée est répartie en tubes de 9 ml, stérilement.

- le milieu est stérilisé à l'autoclave, 20 minutes, à 115° C.

* Solvant :

- formule	Bleu de Pontamine	0,5 mg
	Eau distillée	1 ml

- les références commerciales de la forme utilisée sont :

Pontamine Sky Blue 6 BX, référence 28230

Marque K α K

- le solvant est présenté en ampoules de verre autocassables, contenant 2 ml.

2.1.3.2. Milieu solide servant au dénombrement

Nous utilisons un milieu usuel qui permet un bon développement de notre souche : gélose trypticase soja.

Nous choisirons de préférence la forme préparée par le laboratoire Bio-Mérieux. Elle est commercialisée sous forme d'une base déshydratée.

La formule est :

Hydrolysate tryptique de caséine	15 g
Peptone de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
eau distillée	1 000 ml
pH : 7,3	

Le milieu est stérilisé à l'autoclave, à 121° C pendant 15 minutes.

Nous répartirons extemporanément la gélose en boîtes de Pétri, à raison de 20 ml par boîte.

2.2. Technique

La technique consiste, après reprise du lyophilisat bactérien par un solvant, à effectuer un dénombrement des germes de la suspension bactérienne obtenue.

Le titrage est fait par la technique des dilutions puis numération sur milieu gélose.

Précisons que l'ensemble des manipulations, afin de réduire le risque de contamination, est fait en atmosphère stérile créée par la flamme d'un bec Bunsen, sous hotte à flux lumineux.

L'expérimentation sera faite en parallèle avec les deux solvants de reprise étudiés : l'eau physiologique tamponnée et le solvant coloré.

Pour chaque solvant, nous choisissons arbitrairement un lot de 3 flacons de vaccin. Le protocole suivant a alors été adopté pour chaque solvant :

- chaque lyophilisat est repris, dès sa sortie de la chambre froide, avec 1 ml du solvant. Le lyophilisat se réhydrate rapidement. Nous obtiendrons une meilleure homogénéité de la préparation en agitant chaque flacon.

- les 3 suspensions bactériennes obtenues sont prélevées à l'aide d'une pipette stérile, et rassemblées dans un tube à essais stérile. Une agitation mécanique de quelques secondes au Vortex permet d'obtenir une suspension unique, parfaitement homogène.

- Une série de 8 tubes contenant 9 ml d'eau physiologique tamponnée est préparée.

- Des dilutions de raison 10 de la suspension bactérienne sont alors préparées dans de l'eau physiologique.

- Dès que ces dilutions sont prêtes, 0,05 ml des deux dernières dilutions (10^{-7} et 10^{-8}) sont étalées sur une gélose trypticase soja au moyen d'une pipette Pasteur coudée stérile. Trois boîtes sont ensemencées par dilution.

- Les différentes boîtes sont alors placées à l'étuve à 37° C pour incubation.

- La lecture des résultats consiste au dénombrement des colonies sur chacune d'elles, effectuée après 24 heures et 48 heures d'incubation.

La même technique sera répétée chaque mois pendant toute la durée de l'expérimentation.

2.3. Résultats

Les résultats sont exprimés en nombre de germes par ml de suspension bactérienne. Après avoir compté les colonies sur chacune des 3 boîtes, nous avons fait une moyenne des 3 valeurs. La proportionnalité des valeurs obtenues avec les 2 dilutions successives (10^{-7} et 10^{-8}) a valeur de confirmation des résultats.

Après une incubation de 24 heures, les colonies présentes sur la gélose sont de trop petite taille pour être dénombrées correctement. Ne seront donc considérés que les résultats obtenus après 48 heures d'incubation. Nous avons effectivement signifié, dans un paragraphe précédent que le temps de croissance des mutants réverses de Salmonella abortus ovis était de l'ordre de 48 heures. La lyophilisation a été effectuée le 15 juin 1989. La teneur en germes avant lyophilisation était de 25.10^9 germes par ml.

Nous avons mentionné dans le tableau suivant (tableau 1) les résultats que nous avons obtenu aux dénombrements mensuels effectués sur une durée de 9 mois.

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROTOCOLE :

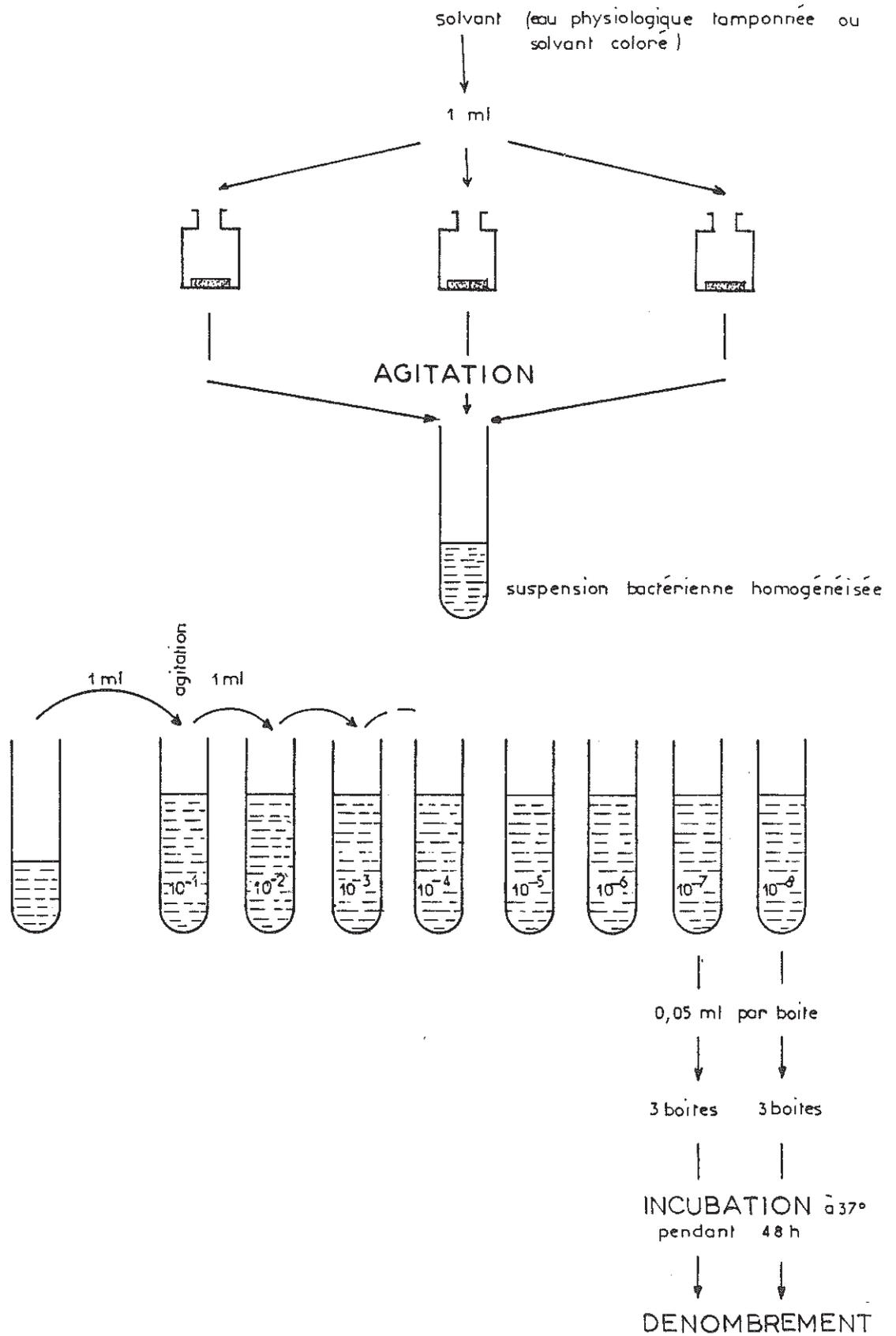


Tableau 1 : Evolution du titre du vaccin lyophilisé étudié après reprise en eau physiologique tamponnée.

DATES	TENEUR EN GERMES
15 juin 1989	22.10^9 germes/ml
10 juillet 1989	22.10^9 germes/ml
10 août 1989	21.10^9 germes/ml
10 septembre 1989	20.10^9 germes/ml
10 octobre 1989	$19,5.10^9$ germes/ml
10 novembre 1989	19.10^9 germes/ml
10 décembre 1989	19.10^9 germes/ml
10 janvier 1990	18.10^9 germes/ml
10 février 1990	15.10^9 germes/ml
10 mars 1990	13.10^9 germes/ml

Tableau 2 : Evolution du titre du vaccin lyophilisé étudié après reprise avec un solvant coloré.

DATES	TENEUR EN GERMES
15 juin 1989	22. 10^9 germes/ml
10 juillet 1989	21. 10^9 germes/ml
10 août 1989	20. 10^9 germes/ml
10 septembre 1989	19. 10^9 germes/ml
10 octobre 1989	19. 10^9 germes/ml
10 novembre 1989	16. 10^9 germes/ml
10 décembre 1989	15. 10^9 germes/ml
10 janvier 1990	15. 10^9 germes/ml
10 février 1990	13,8. 10^9 germes/ml
10 mars 1990	13. 10^9 germes/ml

3) Evolution du titre du vaccin après reprise par un solvant

Le but de l'expérimentation est de comparer le titre du vaccin immédiatement après sa reprise par le solvant et après une heure de conservation à température ambiante.

Les résultats obtenus permettront d'étudier :

- la teneur en germes du vaccin immédiatement après sa reprise et après 1 heure,
- l'importance de la nature du solvant sur l'évolution de ce titre après reprise.

3.1. Matériel

Nous utilisons le même matériel que dans l'expérience précédente :

- tubes à essais stériles, boîtes de Pétri, pipettes Pasteur stériles, pipettes stériles de 1 ml, de 10 ml et agitateur mécanique type Vortex.

- 2 lots de 3 flacons de vaccins (un pour chaque solvant).

- milieux

- . 8 tubes de 9 ml d'eau physiologique tamponnée pour chaque solvant :

- . 3 ampoules de solvant

- . milieu solide : gélose trypticase soja répartie en boîtes de Pétri à raison de 20 ml par boîte.

3.2. Méthodes

Pratiquement, cette étude est menée en même temps que l'expérimentation précédente. Autrement dit, pour chaque solvant, les dilutions en eau physiologique des suspensions bactériennes sont, après dénombrement extemporané, conservées 1 heure sur place au laboratoire, à température ambiante. A l'issue de ce délai, les dilutions adéquates (10^{-7} et 10^{-8}) sont placées sur milieu solide à raison de 0,05 ml par boîte pour dénombrement. On effectue un ensemencement en surface, à l'étaleur. Trois boîtes sont ensemencées par dilution. La manipulation est faite deux fois, une fois après reprise du lyophilisat par l'eau physiologique, un fois après reprise avec le solvant coloré.

Les différentes boîtes sont alors placées à l'étuve à 37° C. On prolonge l'incubation pendant 48 heures. Une comptabilité des colonies sera toutefois tentée après 24 heures d'incubation.

Remarque : Chacune de ces boîtes doit être parfaitement identifiée. Ainsi, il faudra noter sur chacune le nom de la souche, la dilution, la nature du solvant, le moment du repiquage, le numéro de la culture, 3 boîtes sont, en effet, réalisées pour chaque dilution.

3.3. Résultats

Les résultats sont déterminés après comptabilité des colonies sur chaque boîte. Les valeurs publiées donnent le nombre de germes par ml de suspension bactérienne, 1 heure après sa reprise par le solvant.

Cette méthode a été répétée lors de chaque dénombrement mensuel.

Regroupons dans les tableaux 3 et 4 nos résultats.

Il nous a semblé intéressant de figurer l'ensemble de nos résultats sous forme de courbes représentant le nombre de germes viables dans les flacons en fonction du délai de conservation. Nous représenterons ainsi :

- la cinétique d'inactivation du vaccin en cours de conservation :

. déterminée après reprise dans l'eau physiologique tamponnée,

. déterminée après reprise dans le solvant coloré.

- l'influence de la durée de conservation sur la teneur en germes déterminée une heure après la reprise du lyophilisat dans l'eau physiologique tamponnée, puis dans le solvant coloré (Courbes 1 et 2).

Tableau 3 : Evolution du titre du vaccin lyophilisé étudié une heure après sa reprise en eau physiologique tamponnée.

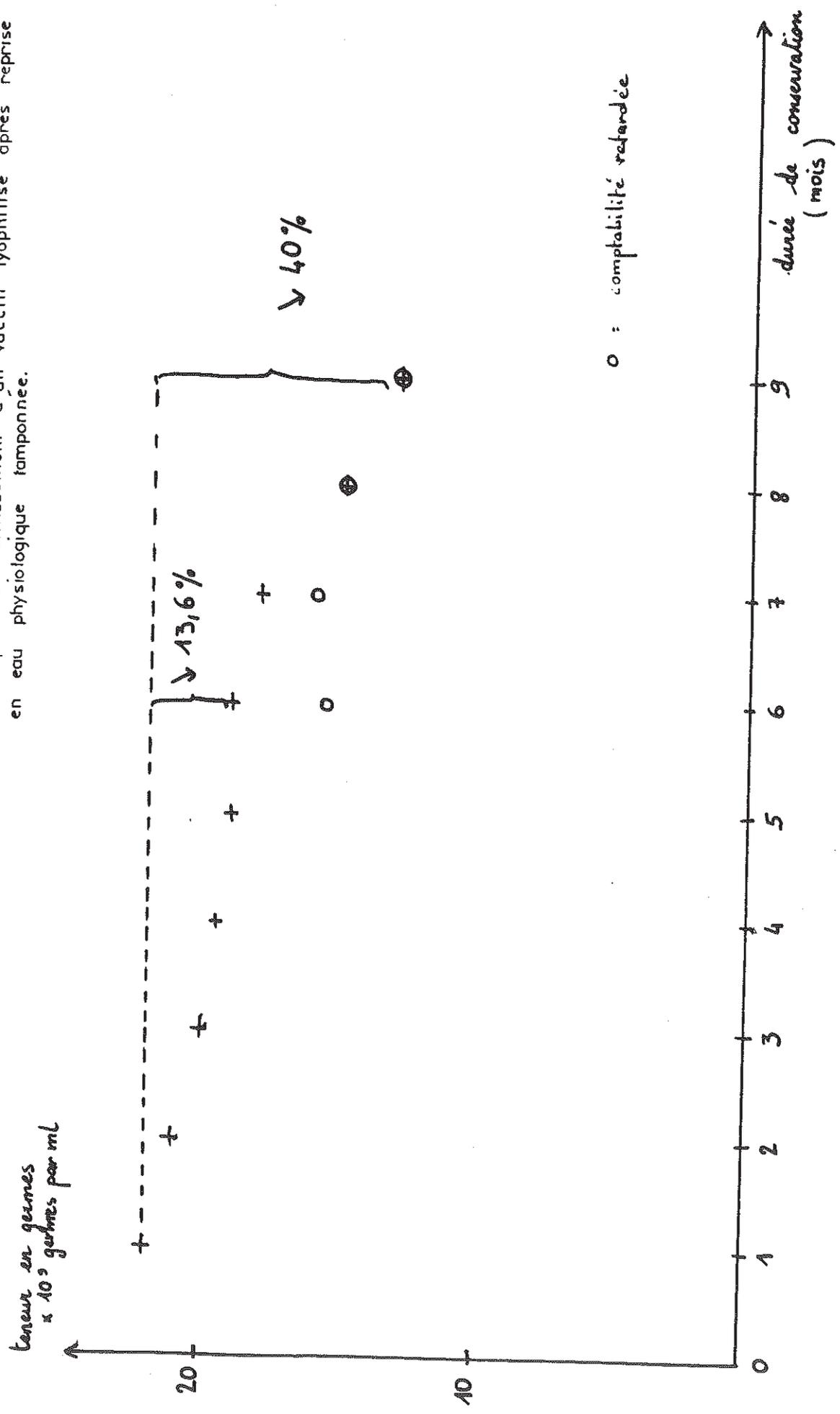
DATES	TENEUR EN GERMES
15 juin 1989	
10 juillet 1989	22. 10^9 /ml
10 août 1989	21. 10^9 /ml
10 septembre 1989	20. 10^9 /ml
10 octobre 1989	19,5. 10^9 /ml
10 novembre 1989	19. 10^9 /ml
10 décembre 1989	15,6. 10^9 /ml
10 janvier 1990	16. 10^9 /ml
10 février 1990	15. 10^9 /ml
10 mars 1990	13. 10^9 /ml

Tableau 4 : Evolution du titre du vaccin lyophilisé étudié une heure après sa reprise par un solvant coloré.

DATES	TENEUR EN GERMES
15 juin 1989	
10 juillet 1989	21. 10^9 /ml
10 août 1989	20. 10^9 /ml
10 septembre 1989	19. 10^9 /ml
10 octobre 1989	18. 10^9 /ml
10 novembre 1989	15. 10^9 /ml
10 décembre 1989	14. 10^9 /ml
10 janvier 1990	14,3. 10^9 /ml
10 février 1990	13,8. 10^9 /ml
10 mars 1990	12,5. 10^9 /ml

COURBE 1

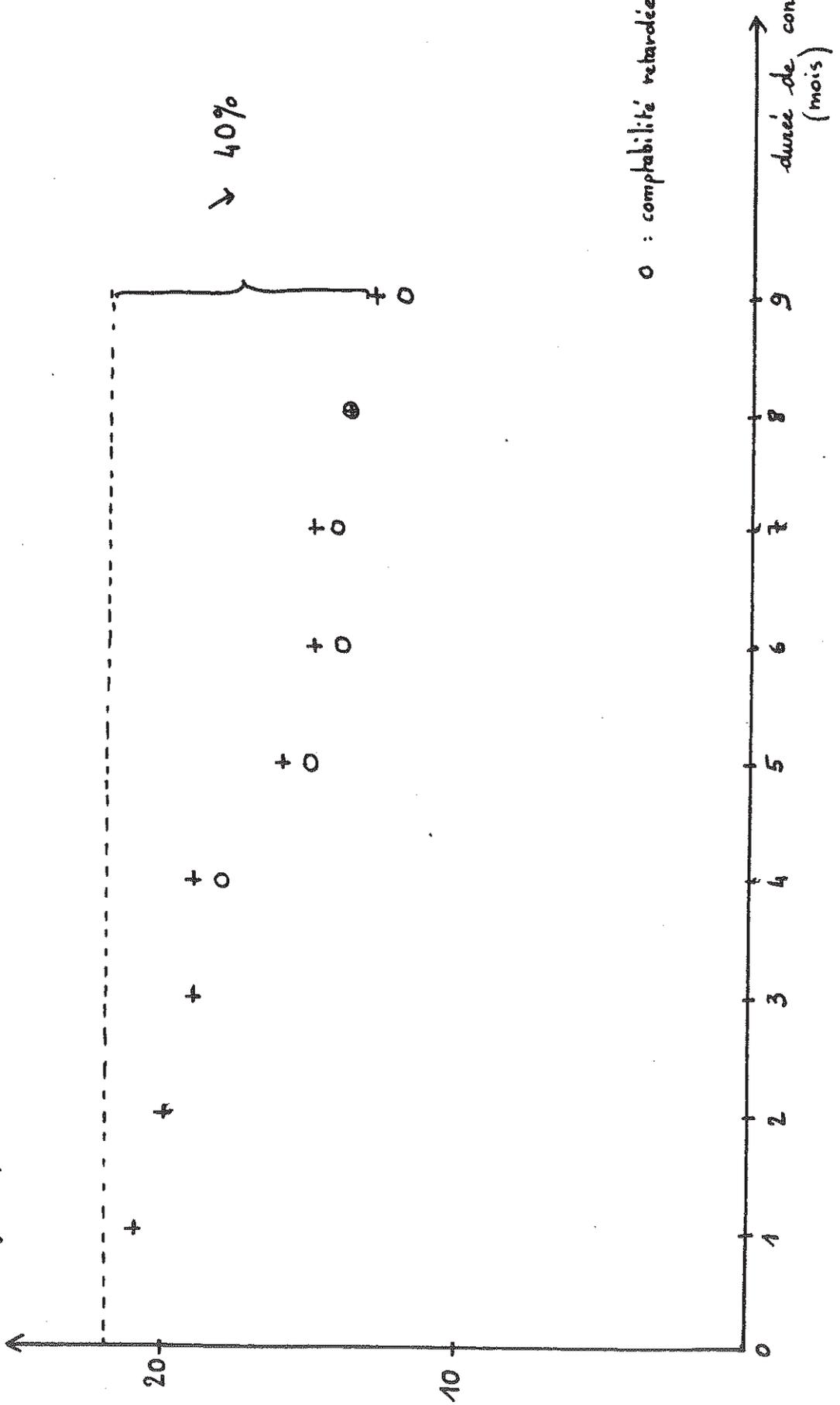
Cinétique de vieillissement d'un vaccin lyophilisé après reprise en eau physiologique tamponnée.



COURBE 2

Cinétique de vieillissement d'un vaccin lyophilisé après reprise par un solvant coloré

teneur en germes
 $\times 10^3$ germes par ml



o : comptabilité retardée

L'interprétation des résultats pourra être facilitée par le calcul de la proportion de germes tués pendant la durée de conservation considérée.

Après 9 mois de conservation en chambre froide du lyophilisat :

- si le lyophilisat est repris par de l'eau physiologique tamponnée :

la diminution du nombre de germes est de 40 %. Après une heure à température ambiante, la proportion de germes tués est la même. Notons qu'après 6 mois de conservation, le taux de mortalité n'était que de 13,6 %.

- si le lyophilisat est repris par un solvant coloré :

la diminution du nombre de germes est de 40 %. Après une heure à température ambiante, le résultat est du même ordre de grandeur (la valeur calculée est de 41,8 %).

Après 6 mois de conservation, la diminution du nombre de germes était déjà de : 31,8 % (comptabilité immédiate).

Nous avons représenté l'ensemble de ces résultats sur les courbes de cinétique (Courbes 1 et 2).

4) Vieillessement accéléré à l'étuve à 37° C

Des expérimentations précédentes de vieillissement de souches bactériennes lyophilisées ont montré l'intérêt du vieillissement à l'étuve en établissant une corrélation entre ce vieillissement accéléré et le vieillissement en temps réel. Il est courant de considérer que 8 jours à 37°C correspondent à 6 mois en chambre froide à + 4°C.

Nous avons effectué cette expérimentation au début du mois de février 1990, c'est-à-dire sur des lyophilisats conservés depuis 7 mois en chambre froide à + 4° C.

L'intérêt de cette partie de nos expérimentations est donc évident : nous allons pouvoir extrapoler nos premiers résultats et nous faire une idée de ce que sera la teneur en germes de notre souche plus d'un an après sa lyophilisation.

4.1. Matériel

Nous travaillons dans les mêmes conditions que précédemment, nous utilisons donc strictement le même matériel.

L'expérience utilise un lot de 3 flacons de vaccin ayant la même durée de conservation en chambre froide. Les flacons numérotés portent la date de mise à l'étuve.

La reprise des lyophilisats ne sera faite qu'avec un solvant, l'eau physiologique tamponnée.

4.2. Méthode

Au jour J_0 , 3 flacons de vaccin lyophilisé sont placés à l'étuve à 37°C .

Au jour J_8 , les flacons sont sortis de l'étuve, chacun est repris avec 1 ml d'eau physiologique tamponnée. Après homogénéisation, les différentes reprises sont rassemblées dans un même tube stérile ; le mélange est à nouveau agité (agitation mécanique avec agitateur type Vortex).

Sur cette suspension bactérienne homogène, on effectue des dilutions de raison 10 dans l'eau physiologique tamponnée.

A l'aide d'une pipette de Duclaux, 0,05 ml des suspensions diluées à 10^{-6} et 10^{-7} sont mis en culture sur 3 boîtes de gélose trypticase soja ; l'ensemencement est un étalement en surface par la technique du râteau. Les milieux sont alors placés à l'étuve à 37°C pendant 48 heures.

Les différentes dilutions de notre suspension bactérienne sont maintenues à température ambiante pendant une heure. Passé ce délai, l'opération est renouvelée.

4.3. Résultats

Ils sont exprimés en nombre de germes par ml. Ce sont les moyennes des 3 valeurs déterminées dans l'expérience. Elles sont mentionnées dans le tableau 5.

En appliquant les "règles" de corrélation entre le vieillissement à l'étuve et le vieillissement à + 4° C, ces résultats correspondent sensiblement au titre de notre souche un an après sa lyophilisation.

5) Interprétations des résultats

Le but de ces expérimentations était l'étude de la conservation d'un vaccin vivant lyophilisé. Cette étude est intéressante dans la mesure où elle nous permet de déterminer l'influence :

- de la durée de conservation,
- de la nature du solvant de reprise,
- du temps de contact avec le solvant.

Alors que nous venons de décrire les méthodes utilisées, il nous a paru important de faire une critique de celles-ci avant de faire une interprétation rendue ainsi plus juste et plus précise de nos résultats.

Tableau 5 : Teneur en germes d'un vaccin lyophilisé conservé 7 mois en chambre froide, puis placé 8 jours à l'étuve à 37° C.

Comptabilité immédiate après reprise en eau physiologique tamponnée	Comptabilité retardée 1 heure après reprise
4,8. 10 ⁹ germes/ml	3,8. 10 ⁹ germes/ml

5.1. Critiques de la méthode

* Le premier temps de chaque manipulation consistait à sélectionner un lot de 3 flacons de vaccins. Ainsi, les valeurs publiées représentaient des teneurs en germes moyennes et non mesurées sur un flacon unique. Elles sont donc plus représentatives de l'ensemble des vaccins d'un même lot de fabrication.

* Chaque dénombrement est effectué trois fois dans les mêmes conditions. Les calculs ont toujours été effectués sur la moyenne du nombre de colonies trouvé sur les 3 boîtes. On limite ainsi le risque d'erreur tout d'abord en remarquant plus aisément les résultats faussés par de mauvaises manipulations, mais aussi en donnant des valeurs moyennes.

* Même après avoir déterminé l'ordre de grandeur de la teneur en germes du vaccin, nous avons toujours fait des ensemencements de 2 voir 3 dilutions successives de la suspension bactérienne.

* Technique de dilutions : dans la pratique, il existe plusieurs façons de faire des dilutions de raison 10 dans un solvant :

- 1 ml + 9 ml de solvant
- 10 ml + 90 ml de solvant
- 100 ml + 900 ml de solvant.

Nous avons dans cette expérimentation choisi le 1^{er} module plus commode à mettre en place. Il nous a paru intéressant d'apprécier la fiabilité de cette méthode.

Pour cela, nous avons effectué 9 dénombrements parallèles par dilution de notre vaccin. Ainsi, nous avons sélectionné 9 lots de 3 flacons de vaccin lyophilisé. Chaque lyophilisat a été repris par 1 ml d'eau physiologique tamponnée. Nous avons déterminé la teneur en germes de ces 9 suspensions bactériennes par le protocole utilisé dans l'expérimentation précédemment décrite. Les dilutions ont été effectuées dans l'eau physiologique tamponnée.

Remarque : Nous avons pris la précaution de ne sortir chaque lot de flacons qu'au moment de son utilisation. La manipulation n'étant effectuée que par une seule personne, le maintien à température ambiante des derniers flacons utilisés aurait pu fausser les résultats.

Le tableau suivant présente les différentes valeurs trouvées (tableau 6) :

Tableau 6 : Valeurs comparées de 9 dénombrements effectués en parallèle sur un même vaccin lyophilisé.

IDENTIFICATION DU LOT ETUDE	TENEUR EN GERMES PAR ML
Lot 1	7,2. 10 ⁹
Lot 2	11,5. 10 ⁹
Lot 3	13,5. 10 ⁹
Lot 4	13. 10 ⁹
Lot 5	5,5. 10 ⁹
Lot 6	13,8. 10 ⁹
Lot 7	12,6. 10 ⁹
Lot 8	12,9. 10 ⁹
Lot 9	8,6. 10 ⁹

Certains éléments simples de statistique permettent d'interpréter ces résultats.

Nous allons sur ce petit échantillon calculer l'écart-type. C'est un paramètre mesurant la dispersion des valeurs autour de leur moyenne. Plus l'écart-type est faible, plus les valeurs sont "resserrées" autour de leur moyenne, inversement, plus l'écart-type est grand, plus la distribution est étalée.

On utilise la formule suivante :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

où σ = écart-type

x = variable - Ici teneur en germes déterminée par cette méthode
de dilution.

\bar{x} = moyenne des différentes mesures

n = nombre d'éléments appartenant à l'échantillon étudié.

Par application,

$$\bar{x} = 10,95 \cdot 10^9$$

$$n = 9$$

$$\begin{aligned} \text{et } \sigma &= \sqrt{\frac{74,92}{9}} \cdot 10^9 \\ &= 3,06 \cdot 10^9 \end{aligned}$$

On trouve donc une valeur pour l'écart-type relativement élevée. En effet, une autre façon moins mathématique d'exprimer ce résultat est de dire que les dénombrements effectués par cette technique de dilution peuvent subir des fluctuations de pratiquement 30 % en fonction de la technique de manipulation.

Ces résultats personnels sont du même ordre de grandeur que ceux trouvés par d'autres équipes avec la même technique de dilutions (1 + 9).

Après avoir consulté d'autres études utilisant des dilutions pour un dénombrement, il apparaît que plus les dilutions se font sur des grands volumes (100 + 900 ml de solvant), plus les résultats sont reproductibles (l'écart-type est beaucoup plus faible).

A ce niveau de notre réflexion, on prend conscience de l'importance de ce paragraphe pour l'interprétation des résultats de nos expérimentations.

5.2. Influence de la durée de conservation d'un vaccin vivant lyophilisé sur sa teneur en germes. Etude comparée entre deux solvants de reprise, l'eau physiologique tamponnée et un solvant coloré

Bien qu'actuellement la lyophilisation soit une des meilleurs méthodes pour conserver des souches microbiennes vivantes, il existe toujours au cours du vieillissement de celles-ci une proportion plus ou moins grande de germes qui meurent.

5.2.1. Reprise du lyophilisat par de l'eau physiologique tamponnée

Après 6 mois de conservation dans les conditions préalablement décrites, la teneur en germes n'a diminué que de 13,6 %. L'objectif de notre expérimentation est de savoir si l'on peut conserver notre souche sous forme lyophilisée dans le but d'une utilisation comme vaccin.

Autrement dit, après une conservation pendant x semaines ou mois (x devant être précisé), restera-t-il suffisamment de germes dans le lyophilisat pour envisager son utilisation sur le terrain ?

Les essais de vaccination effectués parallèlement avec cette souche utilisaient des préparations titrant environ 10^9 germes.

Par conséquent, malgré cette baisse de 13,6 %, le titre des flacons est encore du même ordre de grandeur. On ne peut donc pas considérer cette baisse comme significative dans le cadre de notre étude.

Le rythme de la décroissance semble s'accélérer au cours des 3 derniers mois étudiés. Cependant, en tenant compte de la remarque précédente, concernant la fiabilité de la méthode, il faut se demander s'il est très juste de conclure à une accélération du vieillissement sur seulement deux valeurs. La cassure de la courbe est due à deux valeurs (février et mars) ; peut-être sont-elles moins fiables que l'ensemble des autres mesures ? Il aurait certainement été intéressant d'étudier plus longtemps cette cinétique du titre du vaccin, en temps réel. Effectivement, les résultats extrapolés du vieillissement à l'étuve permettent de supposer quelle serait la teneur en germes du vaccin après 1 an de lyophilisation et de conservation dans des conditions normales mais ne renseignent pas sur l'allure précise de la cinétique. La linéarité de celle-ci observée dans les 3 premiers trimestres se maintient-elle ?

En s'appuyant sur les expériences antérieures, si l'on considère que 8 jours passés à l'étuve à 37° C équivalent sensiblement à 200 jours à $+4^{\circ}$ C, on peut penser qu'un an après sa lyophilisation, la souche titrerait environ $4,8 \cdot 10^9$ germes par ml. Cette valeur est donc encore suffisante pour envisager une utilisation vaccinale.

Ces résultats personnels nous permettent donc d'écrire que la souche étudiée SAO 24337 1400 Rv lyophilisée et conservée à + 4° C, à l'abri de la lumière peut être utilisée à des fins vaccinales, un an après sa lyophilisation le solvant de reprise étant de l'eau physiologique tamponnée.

5.2.2. Reprise du lyophilisat par un solvant coloré

Nous avons mené cette étude du vieillissement d'une souche vivante lyophilisée en parallèle avec deux solvants dont un coloré. L'expérimentation a donc permis de considérer 2 paramètres, la durée de conservation mais aussi la nature du solvant de reprise.

Comme avec l'eau physiologique tamponnée, nous observons dans le solvant une diminution progressive, très régulière du nombre de germes par flacon, au cours du temps. Cependant, nous obtenons des valeurs plus faibles avec le solvant coloré.

Cette constatation ayant été faite pour chaque dénombrement, nous pouvons en déduire que la nature du solvant de reprise a une incidence sur le titre de la suspension bactérienne obtenue.

Indépendamment du "vieillissement naturel" enregistré au cours de la conservation, le solvant coloré (Bleu de Pontamine) détruit des bactéries au moment de la reprise du lyophilisat.

En conclusion, ces premiers résultats et, en particulier la linéarité des cinétiques, montrent que la diminution du nombre de germes enregistrée est le fait du "vieillissement naturel" de la souche lyophilisée ; il n'y a pas d'accidents en cours de conservation et le titre après un an de conservation semblerait maintenu dans les normes.

En outre, il ne faut pas négliger l'importance de la nature du solvant de reprise qui peut modifier le nombre de germes au moment de l'utilisation. Dans l'éventualité d'une mise en forme commerciale de cette souche vaccinale, il faudrait s'interroger sur les critères de choix du solvant de reprise.

5.3. Influence du temps de contact d'un vaccin vivant lyophilisé avec son solvant sur la teneur en germes. Etude comparée entre deux solvants de reprise : l'eau physiologique tamponnée et un solvant coloré

5.3.1. Reprise du lyophilisat par de l'eau physiologique tamponnée

Pendant les 6 premiers mois de l'expérimentation, les comptabilités immédiate et retardée (une heure après la reprise) donnent les mêmes valeurs. Par contre, écoulé ce délai, on constate un décalage non négligeable entre les 2 valeurs. Notons que les résultats trouvés au 6 ième mois ne sont certainement pas très exacts : ils s'expliquent probablement par les fluctuations liées à la technique de dilution utilisée pour le dénombrement.

Le vieillissement est un phénomène cumulatif pour les cellules vivantes. Plus une bactérie vieillit, plus elle augmente son risque de mourir, plus elle est sensible aux facteurs destructeurs. Autrement dit, plus la souche étudiée vieillit, plus elle est sensible aux propriétés du solvant.

Dans le cadre d'une utilisation vaccinale, il faudra donc limiter le temps de contact de la souche et du lyophilisat.

Nous avons également fait un dénombrement une heure après la reprise des souches ayant subi un vieillissement à l'étuve à 37° C. Les résultats obtenus concordent avec les constatations faites sur les 9 mois d'étude du vieillissement en temps réel.

5.3.2. Reprise du lyophilisat par un solvant coloré

L'influence du temps de contact est visualisée plus tôt dans l'expérimentation, dès le 4 ième mois de conservation. Nous observons un prallèlisme assez net entre les deux cinétiques, dénombrement immédiat et dénombrement après 1 heure à température ambiante. La souche en vieillissant augmente sa sensibilité non seulement au temps de contact avec celui-ci mais aussi à la nature du solvant. On visualise moins nettement ce phénomène qu'avec l'eau physiologique tamponnée pour laquelle seul le temps de contact était un facteur fragilisant.

En conclusion, nous devons retenir que le temps de contact de la souche lyophilisée avec son solvant de reprise est un facteur dont dépendra le titre de la suspension bactérienne. Lors d'une utilisation vaccinale, il faudra administrer la préparation dans l'heure qui suit la reprise du lyophilisat, reprise elle-même effectuée dès la sortie du lyophilisat de la chambre froide. Maintenir un temps de contact plus prolongé semble peu raisonnable, le titre du vaccin devenant incontrôlé et l'activité du vaccin probablement moins sûre.

5.4. Conclusions

Etant donnée la fiabilité de la méthode, nous pouvons déduire de notre expérimentation :

- qu'une conservation pendant un an en chambre froide, à + 4° C, à l'abri de la lumière, du vaccin lyophilisé maintient une teneur en germes compatible avec une utilisation sur le terrain.

- que la nature du solvant modifie la cinétique du vieillissement de la souche lyophilisée. L'utilisation d'un solvant sophistiqué détruit en effet davantage de germes et plus rapidement que l'eau physiologique tamponnée. On pourra se demander quel est l'intérêt d'utiliser ce type de solvant.

- que le temps de contact du lyophilisat avec son solvant de reprise est très important. Au bout d'une heure, nous enregistrons déjà une baisse conséquente du titre par rapport à celui déterminé extemporanément. Il faut limiter l'utilisation vaccinale de la suspension bactérienne à la première heure qui suit sa reconstitution.

Lors d'une réflexion plus fine, il sera intéressant de se demander si la nature du milieu de lyophilisation utilisé a conditionné ces résultats et dans quelles proportions.

5 ième partie :
UTILISATION POUR LA
FABRICATION D'UN VACCIN

Au fil de notre étude, après avoir montré l'importance de la mise au point d'une prophylaxie médicale efficace de la salmonellose ovine, nous avons donc isolé un mutant réverse d'une souche sauvage, particulièrement intéressant pour son grand pouvoir immunogène. La lyophilisation a, dans un deuxième temps, été envisagée comme moyen de conservation de cette souche vivante. La cinétique du vieillissement de la souche, en particulier, permet de conclure que la forme lyophilisée conserve les propriétés de la souche vaccinale et une teneur en germes suffisante.

Nous sommes donc en présence d'éléments permettant d'envisager la fabrication expérimentale d'un vaccin.

Si l'on décide d'utiliser nos résultats pour fabriquer un vaccin, différents points doivent être précisés :

- la forme lyophilisée
- le colorant
- la teneur en germes
- la présentation du vaccin
- l'utilisation du vaccin.

1) La forme lyophilisée

1.1. Intérêt de cette forme galénique

La lyophilisation est maintenant particulièrement utilisée dans l'industrie car elle constitue un excellent moyen de conservation. Il est effectivement reconnu que cette technique conserve la viabilité et les propriétés des micro-organismes. Notre propre expérimentation a montré que la majorité des micro-organismes présents dans nos préparations lyophilisées survivaient à ce traitement et conservaient leurs propriétés biochimiques.

L'innocuité et le pouvoir immunogène de la souche n'ont pas été réétudiés après lyophilisation ni sur l'animal de laboratoire, ni sur le mouton. Cependant, le recul que nous avons sur la technique de lyophilisation suffit pour nous permettre de penser que ces caractères ne peuvent être modifiés par ce traitement.

Outre les excellents résultats procurés dans la conservation de souches bactériennes vivantes, la lyophilisation est intéressante car elle constitue une technique très bien maîtrisée actuellement. Il est donc facile de préparer dans de bonnes conditions une quantité importante de vaccin lyophile.

La forme lyophilisée est donc une présentation galénique :

- facile à préparer,
- permettant une bonne conservation d'une souche vivante.

1.2. Conditions de mise en place du protocole de lyophilisation

L'opération de lyophilisation ne sera lancée que dans deux conditions :

- vérification de la pureté de la souche et de son identité par techniques de bactériologie classiques,
- obtention de cultures suffisamment abondantes de la souche.

1.3. Critères définissant la lyophilisation effectuée

Dans l'objectif de la préparation d'un vaccin, toutes les étapes conduisant au produit final que constitue le vaccin prêt à être utilisé, doivent être parfaitement définies, de manière à être répétées. Ainsi, la lyophilisation de notre souche est caractérisée par certains éléments que nous devons présenter.

1.3.1. Choix du milieu de lyophilisation

Dans notre étude, le milieu de lyophilisation utilisé est composé comme suit :

peptone pancréatique de caséine	:	25 g
glutamate de sodium	:	10 g
saccharose	:	50 g
eau qsp	:	1000 ml

Il existe différents substrats de lyophilisation ; on utilise souvent des milieux à base de lactose. Des essais comparatifs avec différents substrats dont les principaux constituants sont le lactose, la gélatine, le saccharose, l'eau physiologique ont été faits sur des souches de Salmonella abortus ovis. On s'est particulièrement intéressé à l'humidité résiduelle des lyophilisats, à la quantité de germes détruits par la lyophilisation, à la viabilité des bactéries après lyophilisation.

Il semble que le saccharose se comporte comme un protecteur de lyophilisation vis à vis de notre souche. Ce résultat a motivé le choix du milieu utilisé (élément étudié et fourni par l'Institut de Biologie Animale de Montélimar).

Il pourrait être intéressant dans une étude ultérieure d'étudier précisément ces différents composants des milieux de lyophilisation et de définir l'importance de la composition de ce milieu pour la qualité de la lyophilisation, c'est-à-dire pour la durée de conservation du vaccin lyophilisé et le maintien de ses propriétés. En effet, peut-être peut-on imaginer que certains composants du milieu de lyophilisation pourraient augmenter la durée de conservation du vaccin.

Notre propre expérimentation a utilisé pour ce point des connaissances déjà acquises, mais il est important d'être sensible à l'importance de ce milieu de lyophilisation. Il est certain qu'il influence en partie l'évolution du titre du vaccin au cours de sa conservation.

Quoiqu'il en soit, dans le cadre d'une préparation de vaccin, la composition du milieu de lyophilisation doit être particulièrement définie, mais également sa préparation. Le milieu doit, en effet, être facile à préparer, stable, contrôlable.

1.3.2. Teneur en germes avant lyophilisation

Nous savions que la lyophilisation détruisait une proportion non négligeable de germes pendant son déroulement.

Dans notre expérimentation :

- teneur en germes avant lyophilisation : $25 \cdot 10^9$ germes par ml
- teneur en germes après lyophilisation : $22 \cdot 10^9$ germes par ml.

On constate seulement une diminution de 12 %. Cette valeur est très intéressante : la lyophilisation expérimentale que nous avons effectuée au laboratoire a détruit très peu de germes. En effet, la consultation des résultats obtenus dans des expérimentations précédentes au laboratoire montre que, très fréquemment, après lyophilisation la teneur en germes diminue de 30 à 50 %, il est donc très important de préparer des cultures très abondantes avant de mettre les germes en suspension dans le milieu de lyophilisation. Un dénombrement est toujours effectué à ce niveau pour s'assurer d'un titre suffisamment élevé.

La quantité de germes tués dans notre expérimentation est très faible ; nous devons être très prudent quant à l'interprétation de ce résultat. Il est en effet celui d'un travail expérimental et doit toujours être considéré comme tel. Ainsi, nous devons nous demander s'il serait reproductible, dans quelles mesures les conditions expérimentales de la lyophilisation l'ont influencé.

Si l'on se plaçait dans le cadre d'une production importante de vaccin, la préparation utiliserait la lyophilisation industrielle, plus sophistiquée mais surtout plus fiable car plus constante dans ses résultats (de nombreux systèmes de contrôle sont installés à différents niveaux de la chaîne).

Retenons cependant que la lyophilisation modifie le titre initial de la suspension bactérienne ; il est donc important d'en tenir compte lors de la préparation de cette dernière.

1.3.3. Remplissage des unités de conditionnement

Les flacons de verre dans lesquels est effectuée la lyophilisation serviront également au conditionnement du vaccin lyophile.

Dans notre expérimentation, nous remplissons les flacons à la pipette avec 2 ml de substrat. Les pastilles de lyophilisat seront reconstituées avec 1,5 ml de solvant. Le volume de la suspension obtenue correspond ainsi à 50 doses de vaccin dans les conditions d'utilisation que nous présenterons ultérieurement.

1.3.4. Paramètres de la lyophilisation

Dans le cadre d'une production importante de ce vaccin, la lyophilisation constituerait une phase importante dont les paramètres devraient être finement précisés.

Dans notre travail, la lyophilisation est expérimentale. Elle est caractérisée par des paramètres plus ou moins spécifiques. Nous retiendrons :

- que la congélation se fera entre - 35° C et - 40° C pendant au moins 4 heures.

- que la lyophilisation dure 24 à 48 heures, et se fait à une température voisine de - 50° C.

- que les variations de pression sont évaluées au moment de l'expérimentation pour que la lyophilisation soit correcte.

Ces paramètres tiennent plus à la nature du produit à lyophiliser, souche bactérienne, qu'à la nature même de la souche.

1.4. Contrôles effectués après la lyophilisation

Autant que le déroulement de la lyophilisation, le produit qui en résulte doit être contrôlé. La Pharmacopée Européenne (44) présente les contrôles obligatoires devant être faits sur les vaccins. (Il est évident que ce type de contrôles s'intègre à une utilisation vaccinale vraie de la souche par opposition à une utilisation expérimentale au laboratoire).

On s'intéresse plus particulièrement :

- à l'aspect du produit
- à la masse et à la teneur en eau du lyophilisat.

1.4.1. Aspect du produit

Le but est de vérifier que l'aspect du produit correspond à sa définition, de repérer tout aspect anormal et d'éviter un risque d'erreur. L'examen se fait par observation simple, à l'oeil nu.

* Aspect du lyophilisat :

- le produit lyophilisé est une pastille parfaitement compacte. Son caractère pulvérulent n'est pas spécialement visible si l'on observe le flacon dès la fin de la lyophilisation, avant qu'il y ait eu quelconque manipulation.

- le lyophilisat est de couleur blanche.

* Aspect du produit après reprise par le solvant. On obtient une préparation bleue (couleur du solvant), homogène, d'aspect tout à fait normal. La mise en contact du produit lyophilisé et du solvant entraîne une reconstitution immédiate de la suspension bactérienne, par simple agitation.

1.4.2. Masse du lyophilisat et teneur en eau

Comme nous l'avons vu dans un paragraphe précédent, la lyophilisation consiste en une congélation suivie d'une mise sous vide qui conduit à l'évaporation de la glace. A la fin de cette phase de sublimation, toute la glace a disparu mais le produit n'est par pour autant sec. Il contient encore une humidité résiduelle de l'ordre de 1 à 5 %.

Dans l'industrie, l'opération de lyophilisation est terminée par une dessiccation secondaire destinée à ramener l'humidité résiduelle à une valeur en général inférieure à 3 %.

Dans notre expérimentation, une évaluation de la teneur en eau des lyophilisats a été faite en cours de conservation, sur un lot de trois flacons issus du même lot de fabrication.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Dosage de l'eau dans 3 flacons de vaccin SAO 24337 1400 Rv lyophilisé.

	<u>Masse du lyophilisat</u>	<u>Teneur en eau</u>
Flacon 1	0,0652	5,73 %
Flacon 2	0,0545	7,10 %
Flacon 3	0,0613	6,41 %
Moyenne des valeurs obtenues	0,0603	6,41 %
Ecart-type	0,0054	0,69 %
Coeff. Var.	8,98 %	10,70 %

La détermination de ces taux d'humidité résiduelle se fait classiquement par une perte à la dessiccation. Les échantillons sont placés à l'étuve à 103° C . On suit l'évolution de la masse du lyophilisat en fonction du temps ; quand celle-ci se stabilise à une valeur constante, l'expérience est arrêtée. La différence entre la masse finale et la masse initiale correspond à la quantité de produits volatils contenus dans le lyophilisat, autrement dit, dans le cas présent, à la quantité d'eau.

Dans une opération de lyophilisation, l'humidité résiduelle dans le lyophilisat dépend :

- de la nature du produit,
- du vide dans l'enceinte,
- de la durée de la dessiccation secondaire,
- de la température maximale admise dans le produit sec.

La lecture des résultats obtenus dans notre expérimentation montre qu'une lyophilisation expérimentale ne permet pas d'obtenir des résultats d'aussi bonne qualité que la technique industrielle. Dans notre technique, les modalités de la dessiccation secondaire ne peuvent être finement définies pour contrôler l'humidité résiduelle dans le produit.

D'une manière générale, la conservation d'un produit lyophilisé est directement liée à cette teneur en eau. En effet, si celle-ci est trop importante, le produit aura tendance à se dénaturer au fil du temps.

En conséquence, si l'on voulait utiliser nos résultats pour fabriquer un vaccin lyophilisé, ce paramètre devrait être particulièrement pris en considération.

Remarque : Le calcul des écarts-types pour les deux grandeurs mesurées (masse des lyophilisats, teneur en eau) montre la très faible dispersion des valeurs autour de leur moyenne respective. Par conséquent, on ne peut attribuer les résultats moyennement satisfaisants ni à la technique de dosage, ni à la taille et à la nature du lot de flacons choisis.

Nous pouvons certainement conclure que la lyophilisation expérimentale telle que nous l'avons pratiquée n'est pas suffisamment performante pour obtenir un taux d'humidité résiduelle le plus faible possible.

2) Le colorant

L'ensemble de nos expérimentations a été fait parallèlement avec deux solvants de reprise : l'eau physiologique tamponnée et un solvant coloré, à savoir une solution aqueuse à 0,05 % de bleu de Pontamine.

Nous avons constaté que la nature du solvant influençait nos différents résultats : les germes sont plus sensibles au solvant coloré qu'à l'eau physiologique tamponnée.

Malgré tout, nous avons montré la viabilité de la souche dans ce solvant et la persistance de ces différentes propriétés. L'utilisation de ce solvant coloré n'est donc pas incompatible avec une utilisation vaccinale de la suspension obtenue.

L'intérêt de l'utilisation d'une solution de bleu de Pontamine ne tient pas à la nature même du colorant. En effet, l'intérêt était de trouver un solvant coloré de reprise dans lequel les bactéries soient viables.

Dans la pratique, nous limitons ainsi énormément les risques d'erreur à plusieurs niveaux, une solution colorée étant en effet plus facile à visualiser et à "identifier" :

- risque d'erreur diminué au moment de la fabrication,
- visualisation plus facile du produit (bleu intense) et du dénombrement des gouttes instillées dans l'oeil.

Il aurait été intéressant de faire des études de tolérance du solvant au niveau de l'oeil de l'animal. Le solvant doit en effet être bien toléré et ne pas nuire à la cinétique du produit.

3) La teneur en germes

3.1. Rappel des travaux déjà effectués

Plusieurs expérimentations ont été menées au Laboratoire Départemental de Limoges dans le cadre d'essais d'immunisation avec la souche étudiée SAO 24337 1400 Rv. Nous nous intéresserons plus particulièrement au travail de Coussens-Bourry qui a effectué des essais de vaccination avec la souche réverse directement sur le terrain, dans plusieurs exploitations. Le protocole choisi étudiait parallèlement deux voies d'administrations, la voie conjonctivale et la voie sous-cutanée.

Très précisément, les animaux recevaient :

- 0,1 cc soit 2 gouttes dans l'oeil : voie conjonctivale

- ou 1 cc en voie strictement sous-cutanée

d'une suspension bactérienne titrant entre 10^9 et 10^{10} .

Cette expérimentation a permis de mettre en évidence les possibilités d'utilisation vaccinale de la souche et de conclure que les voies d'administration et les posologies utilisées étaient efficaces. Retenons plus particulièrement l'intérêt de la voie conjonctivale qui procure une immunité aussi efficace mais qui, en outre, utilise des doses moins importantes et est relativement facile à utiliser.

Afin de constituer un dossier le plus complet possible sur notre souche réverse, futur vaccin contre la salmonellose ovine dûe à Salmonella abortus ovis, il sera intéressant :

- de faire une étude comparée des différentes voies d'administration plus précise, sur un plus grand nombre d'animaux,

- de déterminer la plus petite quantité de germes vaccinante pour chaque voie.

3.2. Comment contrôler le titre du vaccin ?

Le vaccin que nous voulons préparer est une souche vivante, donc susceptible d'évoluer.

La lyophilisation constitue une excellente technique de conservation des souches vivantes. Cependant, l'expérience que nous venons de mener montre :

- qu'il y a destruction d'une partie des germes au cours de la lyophilisation,

- que même dans de bonnes conditions, nous enregistrons un vieillissement de la souche au cours de sa conservation.

Autrement dit, connaissant le titre de la suspension bactérienne ayant servi à préparer les lyophilisats, nous pouvons prévoir un intervalle auquel appartiendra le titre du vaccin au moment de son utilisation mais pas le titre précis.

On apprécie ici tout l'intérêt de l'étude de la cinétique du vieillissement de notre souche lyophilisée. En effet, l'analyse de cette cinétique doit nous permettre de déterminer la date limite d'utilisation du vaccin. On limitera effectivement l'utilisation de celui-ci à la période pendant laquelle nous sommes sûrs :

- de la stabilité de la préparation,

- que le vaccin contient encore suffisamment de germes vivants pour être efficace.

L'ensemble de nos travaux nous permet d'assurer l'efficacité et l'innocuité du vaccin vivant lyophilisé SAO 24337 1400 Rv pendant une période de 12 mois.

Notons que les durées de validité des vaccins vivants n'excèdent en général pas 24 mois. Il pourrait être intéressant de poursuivre l'étude du vieillissement de notre souche pendant une année supplémentaire ; la teneur en germes serait au bout de ce délai certainement très inférieure à 10^9 germes par ml. Il serait alors bien d'intégrer à l'étude la recherche de la dose minimale vaccinnante. Cependant, comme nous l'avons souligné plus haut, le vaccin étudié étant une souche vivante, nous ne pouvons connaître son titre au moment de l'utilisation ; il convient donc d'être prudent et de rester au dessus de la dose minimale vaccinnante.

4) La présentation du vaccin

C'est un vaccin lyophilisé devant, avant son utilisation, être remis en suspension dans un solvant adapté.

La reconstitution du lyophilisat ne pouvant être qu'extemporanée, le lyophilisat et le solvant seront présentés dans des conditionnements différents.

L'utilisateur disposera donc d'une boîte contenant :

- un flacon de vaccin lyophile
- une ampoule de solvant de 1,5 ml

correspondant à 50 doses.

4.1. Composition du vaccin

* Vaccin lyophilisé

- Principe actif :

. Salmonella abortus ovis 24337 1400 Rv, mutant réverse isolé au Laboratoire Départemental de Limoges à partir d'une souche sauvage, titrant au minimum 1.10^9 germes.

- Milieu ayant servi à la lyophilisation :

. Peptone pancréatique de caséine (Biokar, réf. 104 003)	0,05 g
. Glutamate de sodium (Prolabo, réf. 2787 2298)	0,002 g
. Saccharose (Prolabo, réf. 2747 8296)	0,1 g
. Eau q.s.p.	2 ml

* Solvant :

- Bleu de Pontamine	0,75 mg
- Eau distillée	1,5 ml

4.2. Réipients

Si l'on envisageait de commercialiser cette préparation vaccinale, la nature des récipients devrait être précisée dans la présentation du produit proposée dans le dossier de l'A.M.M. (Autorisation de Mise sur le Marché).

* Pour le vaccin lyophilisé

On utilise un flacon en verre teinté, type pénicilline, d'une capacité de 5 ml, fermé par un bouchon cannelé, en élastomère puis par une capsule en aluminium sertie.

* Pour le solvant

On utilise une ampoule de verre incolore, autocassable (type injectable).

4.3. Etiquetage

Ce produit, ainsi conditionné, proposé comme vaccin, devra suivre les règles d'étiquetage classique d'un produit à usage vétérinaire et ce, qu'il soit stocké ou distribué.

L'étiquette portera donc les mentions suivantes :

- Vaccin vivant de virulence atténuée contre la salmonellose abortive ovine souche SAO 24337 1400 Rv.
- Nom et adresse du fabricant responsable.
- Usage vétérinaire.
- Ne délivrer que sur ordonnance.
- Conserver à + 4° C, à l'abri de la lumière.
- Date de fabrication et numéro du lot de fabrication.
- Date limite d'utilisation (12 mois après fabrication).
- Formule du produit (libellée comme au paragraphe précédent 4-1).
- Préparation destinée à la voie conjonctivale
- Flacon de 50 doses.
- Mode d'emploi : reprendre le lyophilisat par le solvant coloré ; utiliser la préparation dans l'heure qui suit son obtention.

Une fiche analytique sera associée au conditionnement ; elle mentionnera :

- les indications,
- la posologie,
- les contre-indications,
- les effets secondaires et précautions d'emploi.

Nous développerons ces différents points dans le paragraphe suivant.

Précisons que dans le cadre d'une utilisation commerciale, la référence de l'autorisation de mise sur le marché indispensable devrait figurer sur le conditionnement du vaccin.

5) Utilisation du vaccin

Nous allons nous intéresser :

- aux conditions théoriques d'utilisation du vaccin (indications, contre-indications)
- au protocole d'utilisation du vaccin (mode d'emploi, posologie, technique d'administration, suivi médical).

5.1. Les indications

La souche vaccinale préparée répond aux deux objectifs d'une bonne prophylaxie médicale contre la salmonellose abortive ovine :

- prévention des avortements en milieu sain (non encore contaminé).
- arrêt des avortements et de l'excrétion de germes virulents, en milieu contaminé (51).

Ce type de vaccination ne s'imposerait que dans des régions moutonnières où la salmonellose abortive ovine est endémique, type le Limousin ou le Sud-Est de la France.

Existe-t-il des limites à l'utilisation de ce vaccin, autrement-dit quelles en sont les contre-indications ?

Il faudrait se demander en particulier si ce vaccin est utilisable sur des animaux gravides. Coussens (8) a testé l'innocuité de la souche sur brebis gestantes au Laboratoire Départemental de Limoges. L'expérimentation a été faite sur un petit lot de brebis (8), à leur 3^{ième} mois de gestation. Les résultats de ces travaux tendraient à mettre en évidence l'absence de virulence de la souche sur brebis gravides. Cependant, le trop petit échantillon sur lequel est faite la recherche impose la prudence quant à son interprétation.

Par contre, les diverses expérimentations menées par Nicolas et coll. au sein d'exploitations du département montrent une parfaite tolérance par les femelles gestantes. Ces résultats (non publiés) semblent permettre l'utilisation de ce vaccin sans limite.

Il sera peut-être prudent cependant d'éviter la vaccination en fin de gestation.

5.2. Le protocole d'emploi

- préparation
- technique d'administration
- posologie.

* au moment de l'emploi, l'utilisateur devra reprendre le lyophilisat par 1,5 ml de solvant. La reconstitution de la suspension bactérienne est immédiate. Une simple agitation manuelle confèrera au produit l'homogénéité nécessaire.

Le vaccin devra impérativement être utilisé dans l'heure qui suit cette préparation.

* Le vaccin est destiné à la voie conjonctivale.

* La posologie conseillée est de 30 μ l par animal d'une suspension bactérienne titrant entre 10^9 et 10^{10} germes par ml.

Il sera pratique de joindre au conditionnement un système compte-gouttes (éventuellement gradué) : la vaccination des animaux doit être facile, rapide mais précise.

La présentation proposée correspond donc à 50 doses de vaccin pour cette voie d'administration.

Les essais de vaccination effectués sur le terrain avec cette souche (7) serviront à améliorer ce protocole d'utilisation. Ils précisent en particulier que la période la plus propice à la vaccination est située entre 2 mois et 3 semaines avant la saillie.

5.3. Le suivi médical

- L'expérimentation ci-dessus citée a permis d'étudier non seulement le retentissement sérologique de cette vaccination mais aussi le retentissement clinique. Il en découle que dans les conditions d'utilisation décrites, la vaccination de brebis non gestantes par la souche SAO 24337 1400 Rv n'a pas d'effets secondaires indésirables.

On n'enregistre en effet aucune altération de l'état général : pas d'inappétence, ni de troubles du comportement, ni d'hyperthermie, et aucune réaction locale.

- Cette bonne tolérance nécessite cependant un minimum de précautions d'emploi :

. il convient de travailler dans de bonnes conditions d'hygiène, utilisant en particulier un compte-gouttes stérile.

. les animaux seront de préférence vaccinés en bergerie dans des conditions favorables, limitant au maximum les situations de stress (froid, changement d'alimentation, mauvaise alimentation, transport...).

5.4. Le pouvoir immunitaire du vaccin

Plusieurs expérimentations ont été faites au Laboratoire Départemental de Limoges pour mettre en évidence le pouvoir immunitaire de la souche mutante étudiée SAO 24337 1400 Rv. Intéressons nous plus particulièrement aux travaux de Coussens effectués sur le terrain dans un vrai contexte de vaccination.

Ils mettent en évidence :

- la rapidité de la réponse immunitaire,
- l'intensité de la réponse immunitaire,
- la durée de la persistance des anticorps.

SAO 24337 1400 Rv se révèle très efficace dès la 3 ième semaine suivant l'administration ; l'immunité est donc acquise très rapidement.

La cinétique des anticorps est, d'après ce travail, très variable.

Depuis le début des expérimentations effectuées sur cette souche au Laboratoire d'Analyses et de Recherche de la Haute-Vienne, aucun cas d'avortement n'a été signalé chez une brebis ayant été vaccinée. Autrement dit, l'immunité procurée semble durable. L'injection de "dose rappel" est inutile.

CONCLUSION

Par l'élaboration de ce travail, nous avons eu l'opportunité de nous joindre à l'équipe du Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherches de la Haute-Vienne, dirigé par le Professeur NICOLAS, pour contribuer à la mise au point d'une prophylaxie vaccinale efficace contre la salmonellose abortive ovine.

Ce mémoire constitue pour partie une synthèse des précédentes expérimentations menées à Limoges. Ainsi, après avoir rappelé les caractéristiques de cette pathologie infectieuse et de son responsable Salmonella abortus ovis, nous avons montré les insuffisances des moyens de lutte existants : traitements antibiotiques aux résultats aléatoires, prophylaxie sanitaire difficile à mettre en place, efficacité des vaccins tués limitée. Ces premiers éléments soulignent l'intérêt du travail expérimental entrepris par l'équipe du Professeur Nicolas. Nous avons alors présenté les différentes étapes de l'obtention de souches mutantes réverses de Salmonella abortus ovis, l'agent de sélection étant la streptomycine.

Des essais expérimentaux sur animaux de laboratoire (souris puis brebis) ont permis d'isoler une souche mutante réverse particulièrement intéressante : sa stabilité a été prouvée, son innocuité et son fort pouvoir immunogène ont été mis en évidence.

Nous avons alors énuméré les caractéristiques de cette souche.

Encouragés par ces résultats, nous avons travaillé sur une forme galénique de cette souche, à avenir de vaccin.

L'étude de son vieillissement après lyophilisation expérimentale met en évidence la bonne conservation procurée par cette technique.

Nous avons souligné l'importance de certains facteurs comme la nature du solvant de reprise ou le temps de contact du lyophilisat et de ce solvant.

La dernière partie de notre étude s'attarde sur certains paramètres permettant de présenter les modalités d'utilisation de ce vaccin.

L'ensemble de ces travaux auxquels nous avons participé est très satisfaisant mais appelle certaines recherches complémentaires :

- importance de la nature du milieu de lyophilisation,
- détermination de la dose minimale vaccinale,
- association à d'autres vaccinations,
- etc...

Espérons que le recul qui nous fait défaut verra une régression de la salmonellose ovine grâce aux résultats satisfaisants de cette souche expérimentale devenue vaccin.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alton (G.C.) et Elberg (S.S.)

Rev 1. Brucella melitensis vaccine. A review of ten years study.
Vet. Bull., 1967, 57, 793-800.

2. Barrois (F.) et Meaude (J.Y.)

Efficacité de la terramycine longue action en pathologie infectieuse vétérinaire.

Documentation Pfizer France, 1984.

3. Brugère (H.)

Essai de sélection d'un mutant de virulence atténuée de Salmonella abortus ovis

Th. Doct. Vet., Toulouse, 1984.

4. Calaprice (A.)

Role of the male in the incidence of Salmonella abortion in sheep
Acta, Med. Vet. Napoli, 1969, 5, 277.

5. Chassagne (M.H.)

Contribution à la mise au point d'un vaccin anti-Salmonella abortus ovis.

Th. Doct. en Pharm., Limoges, 1981.

6. Cooper (B.S.)

Evaluation of vaccines against Salmonellosis in sheep
New-Zealand Vet. J., 1967, 15, 215.

7. Coussens-Bourry (C.)

Immunisation contre la salmonellose abortive ovine. Essais réalisés avec une souche mutante de Salmonella abortus ovis, de virulence atténuée.

Th. Doct. Vet., Créteil, 1986.

8. Coussens (F.)

Essai d'innocuité d'un vaccin vivant de virulence atténuée contre la salmonellose abortive ovine.

Th. Doct. Vet., Nantes, 1987.

9. Delahaye (J.)

Le problème des avortements chez la brebis.
Le point Vet., 1973, 1, 5.

10. Elberg (S.S.)

Rev 1 Brucella melitensis vaccine, part II, 1968-1980.
Vet. Bull., 1980, 51, 67-72.

11. Faure (J.)

Contribution à l'étude des avortements salmonelliques ovins dans le département de la Haute-Vienne.
Th. Doct. Vét., Alfort, 1980.

12. Ferron (A.)

Bactériologie médicale
Editions C. et R., 12 ième édition, 1984.

13. Girard (J.C.)

Défense sanitaire du bétail ; les avortements d'origine salmonellique chez la brebis.
France Agricole, 1973, 29, 33.

14. Herzberg (M.) et Elberg (S.S.)

Immunization against Brucella infection.
I. Isolation and characterization of a streptomycin dependant mutant.
J. Bacteriol., 1956, 66, 585-599.

15. Herzberg (M.) et Elberg (S.S.)

Immunization against Brucella infection.
II Effectiveness of a streptomycin dependant strain of Brucella melitensis
J. Bacteriol., 1955, 66, 600-605.

16. Herzberg (M.) et Elberg (S.S.)

Immunization against Brucella infection.
III Response of mice and Guinea pigs to injection of viable and nonviable suspensions of a streptomycin dependant mutant of Brucella melitensis
J. Bacteriol., 1955, 69, 432-435.

17. Ivanov (I.) et Stamenov (B.)

Study of the action of certain antibiotics and of furazolidone to control abortions in ewes caused by Salmonella abortus ovis
Vet. Med. Nauki, 1965, 2, 558.

18. Jack (E.J.)

Salmonella abortus ovis : an atypical salmonelle.
Vet. Rec., 1968, 82, 310.

19. Kauffmann (F.)

The bacteriology of Enterobacteriaceae.
Copenhagen, Munkigaard, 1966, I Vol., 400 pages.

20. Lantier (F.), Pardon (P.) et Marly (J.)

Vaccinal properties of Salmonella abortus ovis mutants for streptomycin : screening with a murine model.
Infection and Immunity, 1981, 34, 492-497.

21. Lantier (F.), Pardon (P.) et Marly (J.)

Immungenicity of a low-virulence vaccinal strain against Salmonella abortus ovis infection in mice.
Infection and Immunity, 1983, 40, 601-607.

22. Le Minor (L.)

Le diagnostic de Laboratoire des Entérobactéries.
Troisième édition de la Tourelle Saint-Mandé, 1967, I vol., 220 pages.

23. Le Terrier (B.)

Enquête sur les maladies abortives des ovins dans le département des Bouches du Rhône.
Th. Doct. Vet., Lyon, 1977.

24. Mura (D.) et Contini (A.)

The importance of the male in the transmission of Salmonella abortion in sheep and goats.
Vet. Ital., 1954, 5, 787.

25. Nicolas (J.A.) et Girard (C.)

Avortements non brucelliques de la brebis.
Bull. des G.T.V., 1975, n° 4.

26. Nicolas (J.A.)

Les avortements de la brebis et de la chèvre.
L'élevage, 1976, 57, 30.

27. Nicolas (J.A.), Pestre-Alexandre (M.), Chauchef (S.), Mounier (M.) et Fériat (M.L.)

Essai d'un mode de vaccination contre la salmonellose ovine. Note 1.
Rev. Med. Vet., 1979, 130, 569.

28. Nicolas (J.A.), Pestre-Alexandre (M.), Delahaye (J.), Chauchef (S.), Mounier (M.) et Fériat (M.L.)

Essai de vaccination par voie orale contre la salmonellose ovine à Salmonella abortus ovis avec une souche vivante et virulente. Note 2.
Rev. Med. Vet., 1981, 130, 892-902.

29. Nicolas (J.A.), Pestre-Alexandre (M.), Chauchef (S.), Mounier (M.) et Fériat (M.L.)

Essai de vaccination par voie orale contre la salmonellose ovine à Salmonella abortus ovis avec une souche vivante et virulente. Note 3.
Rev. Med. Vet., 1981, 132, 297-306.

30. Nicolas (J.A.), Pestre-Alexandre (M.), Cornuejols (M.J.), Mounier (M.) et Fériat (M.L.)

Essai de protocole de vaccination contre la salmonellose ovine à Salmonella abortus ovis. Recherche sur l'efficacité des vaccins tués.
Rev. Med. Vet., 1981, 132, 359-361.

31. Nicolas (J.A.)

Les avortements infectieux de la brebis : de nombreux germes en cause, un diagnostic indispensable.
L'élevage, 1980, 65, 41.

32. Nicolas (J.A.) et Lamachère (M.)

Les avortements infectieux des petits ruminants : leur diagnostic. Les résultats obtenus par un laboratoire de terrain.
Rev. Med. Vet., 1984, 135, 4, 211-215.

33. Pardon (P.)

Aspects de la salmonellose abortive chez les ovins en Bulgarie.
Dossiers de l'Elevage, 1978, 3, 39.

34. Pardon (P.) et Marly (J.)

Experimental Salmonella abortus ovis infection of normal or primo-
infected CD₁ mice.
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 1979, 130 B, 21-28.

35. Pardon (P.), Marly (J.); Girard (J.C.) et Imbert (R.)

Durée et intensité de l'excrétion vaginale de Salmonella abortus ovis
après avortement de la brebis.
Bull. Soc. Vet. Prat. Fr., 1979, 63, 277.

36. Pardon (P.), Girard (J.C.) et Imbert (R.)

Epidémiologie descriptive de la salmonellose abortive ovine dans les
environs de Bellac : 10 ans d'observation.
Bull. Soc. Vet. Prat. Fr., 1979, 63, 523.

37. Pardon (P.), Lantier (F.), Marly (J.) et Sanchis (R.)

Mise au point d'un vaccin contre la salmonellose ovine.
Bull. Mens. Soc. Vet. Prat. Fr., 1980, 64, 465-469.

38. Pardon (P.), Marly (J.), I.N.R.A., Sanchis (R.)

Experimental Salmonella abortus ovis infection in ewes.
Vet. Rec., 1980, 106, 389-390.

39. Pardon (P.), Marly (J.), Sanchis (R.) et Fensterbank (R.)

Influence des voies et doses d'inoculation avec Salmonella abortus
ovis sur l'effet abortif et la réponse sérologique des brebis.
Ann. Rech. Vet., 1983, 14(2), 129-139.

40. Pardon (P.)

La salmonellose abortive ovine.
Extrait de la conférence donnée à l'Alliance Pastorale le 25 février
1985.

41. Pardon (P.), Sanchis (R.) et Dion (F.)

Salmonelloses : Plus d'infectés que de malades.
Patre, 1986, 334, 37.

42. Pardon (P.), Sanchis (R.), Marly (J.), Lantier (F.), Pepin (M.) et Popoff (M.)

Salmonellose ovine due à Salmonella abortus ovis
Ann. Rech. Vet., 1988, 19, 221-235.

43. Peyrataud (M.)

Essai d'obtention d'une souche mutante de Salmonella abortus ovis de virulence atténuée.

Th. Doct. Pharm., Limoges, 1984.

44. Pharmacopée Européenne

1980, 2 ième Edition, partie II, pages 30 et 62.

Monographie générale des immunosérums ou vaccins.

45. Plommet (M.) et Fensterbank (R.)

Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route.

IV Comparaison between two methods of vaccination.

Ann. Rech. Vet., 1979, 10/I, 131-139.

46. Plommet (M.)

La vaccination conjonctivale par la souche B. abortus 19 contre la brucellose ovine. Principe et indications.

Bull. Soc. Vet. Prat. Fr., décembre 1980, T. 64, n° 10, 813-823.

47. Rodolakis (A.), Fensterbank (R.) et Pardon (P.)

Avortement : vaccins vivants.

Patre, 1985, 321, 23-25.

48. Sanchis (R.)

Examination of 112 strains of Salmonella abortus ovis.

Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis., 1980, 3, 517-523.

49. Sanchis (R.), Pardon (P.)

Comparaison de l'activité de 3 vaccins par une méthode expérimentale d'avortements à Salmonella abortus ovis chez la brebis.

Rec. Med. Vet., 1981, 157, 501-505.

50. Sanchis (R.), Pardon (P.)

Infection expérimentale de la brebis avec Salmonella abortus ovis : influence du stade de gestation.

Ann. Rech. Vet., 1984, 15, 97-103.

51. Sanchis (R.), Pardon (P.)

Essai en milieu contaminé d'un vaccin atténué lyophilisé contre l'avortement de la brebis dû à Salmonella abortus ovis.

Ann. Rech. Vet., 1984, 15, 381-386.

52. Sanchis (R.), Malo (N.), Pardon (P.)

Infection naturelle du lapin à Salmonella abortus ovis et essai d'infection expérimentale.

Rev. Med. Vet., 1984, 135, 783-786.

53. Sanchis (R.), Pardon (P.)

Infection expérimentale du bélier par Salmonella abortus ovis

Ann. Rech. Vet., 1986, 17, 387-393.

54. Tadjebakhche (H.), Desliens (M.) et Medjazi (M.)

Etude bactériologique d'enzooties à Salmonella abortus ovis en Iran.

Rev. Med. Vet., 1971, 122, 621.

55. Tadjebakhche (H.), Hosseinoun (M.) et Nadalian (M.)

Infection expérimentale à Salmonella abortus ovis chez la chèvre.

Rev. Med. Vet., 1974, 125, 711.

56. Tadjebakhche (H.), Nadalian (M.) et Hosseinoun (M.)

Infection expérimentale par Salmonella abortus ovis de brebis vaccinées et non vaccinées.

Rev. Med. Vet., 1974, 125, 387.

57. Tadjebakhche (H.) et Nazari (A.A.)

Persistance de Salmonella abortus ovis dans les sols.

Rev. Med. Vet. Pays Trop., 1974, 27, 57.

58. Tadjebakhche (H.) et Nadalian (M.)

Immunité expérimentale causée par Salmonella abortus ovis chez les brebis.

Rev. Med. Vet., 1980, 131, 247-254.

59. Yalcin (N.)

Avortement salmonellique de la brebis.

Elevage ovin, 1971, 77, 14.

TABLEAUX ET ILLUSTRATIONS

Carte 1 : Répartition des avortements dûs à Salmonella abortus ovis en France. (p. 28)

Schéma 1 : Représentation schématique de la technique suivie pour isoler un mutant réverse de SAO. (p. 53)

Schéma 2 : Point triple de l'eau. (p. 72)

Schéma 3 : Schéma d'un lyophilisateur.(p. 73)

Schéma 4 : Représentation schématique du protocole utilisé pour le suivi de l'utilisation du titre du vaccin au cours de sa conservation. (p. 81)

Tableau 1 : Evolution du titre du vaccin lyophilisé étudié après reprise en eau physiologique tamponnée.(p. 82)

Tableau 2 : Evolution du titre du vaccin lyophilisé étudié après reprise avec un solvant coloré. (p. 83)

Tableau 3 : Evolution du titre du vaccin lyophilisé étudié une heure après sa reprise en eau physiologique tamponnée. (p. 86)

Tableau 4 : Evolution du titre du vaccin lyophilisé étudié une heure après sa reprise par un solvant coloré. (p. 87)

Courbe 1 : Cinétique du vieillissement d'un vaccin lyophilisé après reprise en eau physiologique tamponnée. (p. 88)

Courbe 2 : Cinétique du vieillissement d'un vaccin lyophilisé après reprise par un solvant coloré. (p. 89)

Tableau 5 : Teneur en germes d'un vaccin lyophilisé conservé 7 mois en chambre froide, puis placé 8 jours à l'étuve à 37° C. (p. 93)

Tableau 6 : Valeurs comparées de 9 dénombrements effectués en parallèle sur un même vaccin lyophilisé. (p. 95)

Tableau 7 : Dosage de l'eau dans 3 flacons de vaccin SAO 24337 1400 Rv lyophilisé. (p. 111)

TABLE DES MATIERES

=====

	<u>Page</u>
- LISTE DU CORPS ENSEIGNANT DE LA FACULTE	1
- REMERCIEMENTS - DEDICACES	2
- PLAN	6
- INTRODUCTION	14
- <u>1 ère partie : RAPPELS SUR LA SALMONELLOSE ABORTIVE OVINE</u>	15
A) <u>DEFINITION DE LA MALADIE</u>	16
1) <u>Définition bactériologique</u>	16
1.1. <u>Les entérobactéries</u>	16
1.2. <u>Les salmonelles</u>	17
1.3. <u>Salmonella abortus ovis</u>	18
2) <u>Définition clinique de la salmonellose abortive ovine</u>	20
2.1. <u>Pouvoir pathogène</u>	20
2.2. <u>Symptomatologie</u>	22
B) <u>EPIDEMIOLOGIE</u>	23
1) <u>Epidémiologie analytique</u>	23
1.1. <u>Sources d'agents pathogènes</u>	23
1.2. <u>Modes de transmission</u>	24
2) <u>Epidémiologie synthétique</u>	26
3) <u>Répartition géographique</u>	27

C) <u>TRAITEMENT DE LA SALMONELLOSE OVINE</u>	29
D) <u>PROPHYLAXIE DE LA SALMONELLOSE OVINE</u>	30
1) <u>Prophylaxie sanitaire</u>	31
1.1. <u>Mesures offensives</u>	31
1.2. <u>Mesures défensives</u>	32
2) <u>Prophylaxie médicale</u>	32
2.1. <u>Les vaccins tués</u>	33
2.2. <u>Les vaccins vivants</u>	35
<u>2 ième Partie : OBTENTION DE LA SOUCHE MUTANTE REVERSE DE SALMONELLA ABORTUS OVIS</u>	38
A) <u>OBTENTION D'UN MUTANT REVERSE DE BRUCELLA MELITENSIS PAR HERZBERG ET ELBERG</u>	39
1) <u>Obtention de souches streptomycino-dépendantes</u>	39
2) <u>Isolement des souches reverses</u>	40
B) <u>OBTENTION DE LA SOUCHE MUTANTE REVERSE DE SALMONELLA ABORTUS OVIS</u>	41
1) <u>Matériel</u>	41
1.1. <u>Souches</u>	41
1.2. <u>Milieu</u>	44
1.3. <u>Antibiotique</u>	44
2) <u>Obtention de mutants streptomycino-dépendants</u>	50
2.1. <u>Obtention de mutants streptomycino- résistants</u>	50
2.2. <u>Sélection de mutants streptomycino- dépendants</u>	51
3) <u>Obtention de mutants reverses</u>	52

<u>3 ième Partie : LES CARACTERISTIQUES DE LA SOUCHE VACCINALE</u>	54
A) <u>CARACTERES ETUDIES IN VIVO</u>	55
1) <u>Chez la souris</u>	55
1.1. <u>Virulence résiduelle</u>	55
1.2. <u>Degré de protection</u>	56
1.3. <u>Stabilité</u>	57
2) <u>Chez l'ovin : Hôte spécifique de Salmonella abortus ovis</u>	58
2.1. <u>Pouvoir immunogène</u>	59
2.2. <u>Innocuité sur brebis gestantes</u>	60
2.3. <u>Stabilité</u>	61
B) <u>MARQUEURS DE LA SOUCHE SAO 24337 1400 Rv MIS EN EVIDENCE IN VITRO</u>	62
1) <u>Caractères biochimiques</u>	62
2) <u>Caractères culturaux : temps de croissance</u>	63
3) <u>Travaux de Coussens : recherche d'un marqueur biochimique de SAO 24337 1400 Rv</u>	64
3.1. <u>Fermentations sucrées</u>	64
3.2. <u>Recherche d'enzymes</u>	65
C) <u>RESUME DES CARACTERISTIQUES DE LA SOUCHE MUTANTE REVERSE SAO 24337 1400 Rv : SA FICHE D'IDENTITE</u>	67
<u>4 ième Partie : CINETIQUE DU VIEILLISSEMENT DE LA SOUCHE</u>	68
A) <u>LYOPHILISATION DE LA SOUCHE</u>	69
1) <u>Principe de la lyophilisation</u>	69
2) <u>Matériel</u>	71
3) <u>Protocole suivi au laboratoire</u>	74

4) <u>Caractéristiques d'un produit lyophilisé - Modalités de conservation</u>	75
B) <u>LA CINETIQUE DU VIEILLISSEMENT D'UN VACCIN VIVANT LYOPHILISE</u>	76
1) <u>Buts de l'expérimentation</u>	76
2) <u>Etude de l'influence de la durée de conservation sur le titre avec une reprise en eau physiologique tamponnée ou avec un solvant coloré</u>	76
2.1. <u>Matériel</u>	77
2.2. <u>Technique</u>	79
2.3. <u>Résultats</u>	80
3) <u>Evolution du titre du vaccin après reprise par un solvant</u>	84
3.1. <u>Matériel</u>	84
3.2. <u>Méthodes</u>	85
3.3. <u>Résultats</u>	86
4) <u>Vieillissement accéléré à l'étuve à 37 ° C</u>	90
4.1. <u>Matériel</u>	91
4.2. <u>Méthodes</u>	91
4.3. <u>Résultats</u>	92
5) <u>Interprétation des résultats</u>	92
5.1. <u>Critiques de la méthode</u>	93
5.2. <u>Influence de la durée de conservation d'un vaccin vivant lyophilisé sur sa teneur en germes ; étude comparée entre deux solvants de reprise, l'eau physiologique tamponnée et un solvant coloré</u>	97
5.3. <u>Influence du temps de contact d'un vaccin vivant lyophilisé avec son solvant sur la teneur en germes. Etude comparée entre deux solvants de reprise : l'eau physiologique tamponnée et un solvant coloré</u>	100
5.4. <u>Conclusions</u>	101

<u>5 ième Partie : UTILISATION POUR LA FABRICATION D'UN VACCIN</u>	103
1) <u>La forme lyophilisée</u>	104
1.1. <u>Intérêt de cette forme galénique</u>	104
1.2. <u>Conditions de mise en place du protocole de lyophilisation</u>	105
1.3. <u>Critères définissant la lyophilisation effectuée</u>	105
1.4. <u>Contrôles effectués après la lyophilisation</u>	109
2) <u>Le colorant</u>	113
3) <u>La teneur en germes</u>	114
3.1. <u>Rappel des travaux déjà effectués</u>	114
3.2. <u>Comment contrôler le titre d'un vaccin ?</u>	115
4) <u>La présentation du vaccin</u>	116
4.1. <u>Composition du vaccin</u>	116
4.2. <u>Réipients</u>	117
4.3. <u>Etiquetage</u>	117
5) <u>Utilisation du vaccin</u>	119
5.1. <u>Les indications</u>	119
5.2. <u>Le protocole d'emploi</u>	120
5.3. <u>Le suivi médical</u>	121
5.4. <u>Le pouvoir immunitaire du vaccin</u>	122
- CONCLUSION	123
- BIBLIOGRAPHIE	126
- TABLEAUX ET ILLUSTRATIONS	134

RESUME

Dans l'espèce ovine, Salmonella abortus ovis est l'un des principaux responsables d'avortements infectieux, en particulier en Haute-Vienne.

Devant l'inconstance des résultats du traitement et de la prophylaxie, le Laboratoire Départemental de Limoges a cherché à mettre au point un vaccin vivant de virulence atténuée contre cette maladie.

C'est un mutant réverse d'une souche de Salmonella abortus ovis ; l'agent de mutation est la streptomycine.

Après avoir présenté les caractéristiques de cette souche, nous avons montré que la forme lyophilisée conserve les qualités indispensables pour une utilisation vaccinale pendant au moins un an. Les modalités d'utilisation de ce produit ont alors été étudiées pour rendre optimale son efficacité.

MOTS-CLES :

- Ovins
- Avortement
- Salmonella abortus ovis
- Mutant réverse
- Vaccin vivant lyophilisé