

# Optimisation de vaccins contre la colibacillose bovine

L.V. RANDRIANAMBININTSOA<sup>1</sup>, H.H.C. RAKOTONIRINA<sup>1</sup>, M. RAHERIMANDIMBY<sup>2</sup>, O.F. MAMINIAINA<sup>3</sup>

(Reçu le 06/11/2023; Accepté le 15/12/2023)

## Résumé

Deux types d'*Escherichia coli*,  $C_1$  et  $C_2$ , entrant dans la confection d'un vaccin contre la colibacillose bovine à Madagascar, sont étudiés. Le comptage des bactéries s'est fait par la cellule de Malassez. Les  $DL_{100}$  des deux souches sont respectivement de  $1,09 \times 10^8$  et  $1,66 \times 10^7$  bactéries/ml. Elles sont inactivées par le formol à 5% pour fabriquer les antigènes respectifs à un titre de  $2 \times 10^9$  bactéries/ml. Les antigènes ainsi obtenus sont additionnés d'adjuvant à base d'alun de potassium pour avoir les prototypes de vaccin  $P_1$  et  $P_2$ . Chaque prototype de vaccin a été injecté par voie sous-cutanée à des lots de souris, suivi d'un rappel après 15 jours de la première dose. Les lots de souris vaccinés sont mis à l'épreuve après 15 jours de la dose de rappel et reçoivent chacun la  $DL_{100}$  de la souche. Pendant le temps d'observation de 10 jours, les souris vaccinées avec  $P_1$  sont protégées contre  $C_1$  et celles recevant  $P_2$  sont protégées contre  $C_2$ . Par contre,  $P_1$  ne protège pas les souris contre  $C_2$  et  $P_2$  ne les protège pas contre  $C_1$ . La durée de protection est de 12 mois. Les 2 prototypes du vaccin ont gardé leur efficacité durant 6 mois de conservation à 4°C.

**Mots clés:** *Escherichia coli*, vaccin, colibacillose bovine

## Optimization of vaccine against bovine colibacillosis

### Abstract

Two types of *Escherichia coli*,  $C_1$  and  $C_2$ , used in the making of a vaccine against bovine colibacillosis in Madagascar, are studied. Bacteria were counted by the Malassez cell. The  $LD_{100}$  of the two strains are respectively  $1.09 \times 10^8$  and  $1.66 \times 10^7$  bacteria/ml. They were inactivated by 5% formalin to produce the respective antigens at a titer of  $2 \times 10^9$  bacteria/ml. The antigens thus obtained are added with adjuvant based on potassium alum to obtain vaccine prototypes  $P_1$  and  $P_2$ . Each vaccine prototype was injected subcutaneously into batches of mice followed by a booster after 15 days of the first dose. The batches of vaccinated mice are tested after 15 days of the booster dose and each receive the  $LD_{100}$  of the strain. During the 10 days observation time, mice vaccinated with  $P_1$  are protected against  $C_1$  and those receiving  $P_2$  are protected against  $C_2$ . On the other hand,  $P_1$  does not protect mice against  $C_2$  and  $P_2$  does not protect them against  $C_1$ . The duration of protection is 12 months. The 2 prototypes maintain their effectiveness for 6 months of storage at 4°C.

**Keywords:** *Escherichia coli*, vaccine, bovine colibacillosis

## INTRODUCTION

D'après Theodor Escherich en observant la fréquence des diarrhées néonatales, le colibacille pourrait être impliqué dans les entérites (Kaper *et al.*, 2004). Après la seconde guerre mondiale, les connaissances humanitaires ont convergé vers la virulence de certaines souches d'*Escherichia coli*. Dans les années 1950, de nombreuses souches d'*Escherichia coli* ont été responsables des diarrhées infantiles (Kaper *et al.*, 2004).

*E. coli* constitue la microflore commensale intestinale de l'humain et des animaux à sang chaud. Son établissement dans le tractus digestif s'effectue durant les premières heures ou journées qui suivent l'accouchement. *Escherichia coli* constitue alors tout au long de la vie de l'hôte l'espèce bactérienne dominante de la flore aérobie facultative intestinale. *Escherichia coli* est sans doute l'organisme vivant le plus étudié à ce jour. En effet, l'ancienneté de sa découverte et sa culture aisée (division cellulaire toutes les vingt minutes à 37 °C dans un milieu riche) en font un outil d'étude de choix. La profusion de publications scientifiques qui la mentionnent en témoigne.

Comme la formation d'hydrocarbures volatils impliquant une seule enzyme la photodécarboxylase d'acide gras (FAP) des microalgues, dans *Escherichia coli* illuminé, la coexpression de FAP et de thioestérase d'acide gras à chaîne moyenne entraîne la libération continue d'hydrocarbures volatils (Moulin, Légeret *et al.*, 2019).

*Escherichia coli* est un bacille mobile à cils péritriches gram négatif, aéro-anaérobiose facultative, non-sporulée, radio-résistant de la famille des Enterobacteriaceae (Balière, 2016).

Sur une culture sur gélose au sang, sa forme est arrondie surélevée, de surface lisse à bord régulier de couleur grise bleutée à centre opaque gris. Sa taille varie en fonction des conditions de croissance (entre 0,5 à 3 µm), pesant de 0,5 à 5 picogrammes (un millième de milliard de gramme) (Sandrine, 2021). Les bactéries en croissance rapide étant plus allongées et donc plus grandes que les bactéries quiescentes. Le diamètre d'*Escherichia coli* est de 0,5 µm en moyenne.

*Escherichia coli* est associé à de nombreuses pathologies intestinales et extra-intestinales, tant chez l'homme que chez les animaux domestiques (Rycke, 1991), c'est la colibacillose. La colibacillose est la maladie due à l'infection de l'agent pathogène *Escherichia coli*. Selon le type et son pouvoir pathogène des différents symptômes peuvent être leur caractéristique; et selon la localisation de l'infection, *Escherichia coli* est classée d'être extra-intestinale (ExPEC) ou intra-intestinale (InPEC).

Chez les animaux, *Escherichia coli* est responsable de nombreuses maladies: mammites, métrites, entérites, septicémie chez le veau nouveau-né (Sandrine, 2021). Les souches d'*Escherichia coli* agent responsable des mammites, des métrites et de la septicémie sont des bactéries pathogènes extra-intestinales en provoquant des infections en dehors de l'intestin. Elles sont incapables de produire une infection intra-intestinale mais peuvent coloniser le tractus intestinal (Jauréguy, 2009).

La mammite est une infection de la mamelle par des bactéries qui traversent l'orifice ou sphincter du trayon. L'excrétion des toxines par les bactéries entraîne une dilatation du capillaire et les leucocytes sortent du vaisseau sanguin entraînant ainsi une inflammation dans la mamelle (Filion, 1948).

<sup>1</sup> Laboratoire de Contrôle Qualité des Vaccins Vétérinaires, Institut Malgache des Vaccins Vétérinaires, Antananarivo, Madagascar

<sup>2</sup> Mention Biochimie Appliquée, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, Madagascar

<sup>3</sup> Département d'Enseignement des Sciences et de Médecine vétérinaire, Faculté de Médecine, Université d'Antananarivo, Madagascar

La métrite est une inflammation de la paroi utérine chez les vaches laitières, entraînant la mort des animaux, une diminution du taux de natalité, de la production de lait et des pertes économiques (Ma *et al.*, 2018). Elle est causée par une infection bactérienne et elle est presque toujours observée après une mise-bas anormale ou une infection utérine importante. Juste après le vêlage, l'utérus constitue un environnement idéal pour la croissance bactérienne.

La septicémie colibacillaire est une maladie due au passage des bactéries dans le sang. Elle prend l'allure de la forme aiguë et apparaît au cours des premiers jours de la naissance et le plus souvent sans signes cliniques mais le sujet ne boit pas, faible, abattu, à tachycardie et dont la température descend au-dessous de la normale. Les post-septicémies peuvent entraîner de l'arthrite, boiterie, méningite, opisthotonos (contracture des extenseurs ou la tête et le cou sont portés haut avec le dos en concave) et nystagmus (mouvements involontaires sans arrêt des globes oculaires) (Ultra, 2020).

Dans l'infection intra-intestinale, la pathogénicité d'*Escherichia coli* dans l'intestin des animaux engendre généralement la diarrhée qui la caractérise. Des chercheurs les classifient dans leur structure et les noms du groupe; actuellement six groupes sont présentés dans la littérature médicale selon leurs principaux symptômes ou d'autres caractéristiques de groupe (Maris, 2016):

- EHEC (*Escherichia coli* entérohémorragique): les toxines ressemblent celles de Shiga; il provoque la diarrhée sanglante avec des complications,
- ETEC (*Escherichia coli* entérotoxigène): il produit des toxines sécrétoires qui entraînent la diarrhée aqueuse,
- EPEC (*Escherichia coli* entéropathogène) avec des toxines similaires à la toxine de Shigella entraînant la diarrhée aqueuse ou sanglante,
- EIEC (*Escherichia coli* entéroinvasive) qui envahit les cellules épithéliales et provoque la diarrhée aqueuse,
- EAEC (*Escherichia coli* entéroadhérent) qui adhère aux cellules intestinales et entraîne la diarrhée aqueuse,
- EAaggEC (*Escherichia coli* entéroaggrégatif) qui se groupe en amas dans les cellules intestinales et provoque la diarrhée aqueuse mucoïde chronique.

Chez l'homme, des phénotypes de résistance des souches d'*Escherichia coli* responsables d'infections urinaires était étudiés au laboratoire du Centre Hospitalo-Universitaire de Befelatanana Antananarivo Madagascar (Rakotovoava-Rava-hatra *et al.*, 2017). L'antibiorésistance constitue la principale menace sanitaire actuellement. Elle consiste en la destruction d'un antibiotique avant même que celui-ci pénètre la cellule via la sécrétion par la bactérie d'une enzyme capable de détruire des liens chimiques nécessaires à l'intégrité fonctionnelle du médicament. C'est donc une stratégie offensive par laquelle la bactérie inactive l'antibiotique. Les bêta-lactamases sont un exemple d'enzymes produites par les bactéries qui inactivent les B-lactamines, telles les pénicillines et les céphalosporines (Khellafi *et al.*, 2009).

A Madagascar, la prise d'antibiotiques sans consultation médicale, la fréquence de prise des médicaments, l'insuffisance des gestions des déchets des antibiotiques qui ne sont plus utiles et leurs rejets dans l'environnement augmentent encore la résistance des bactéries aux antibiotiques. *Escherichia coli* est parmi les entérobactéries qui ont perdu leur sensibilité aux antibiotiques: l'amoxicilline (15,4%) et l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (15,2%) (Ramilitiana *et al.*, 2014). Le vaccin est l'un des principales solutions pour cette antibiorésistance.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Les souches vaccinales

Deux types de souches d'*Escherichia coli*, C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub>, sont utilisées dans la fabrication des vaccins de BICHARCOLI® produit par l'Institut Malgache des Vaccins Vétérinaires (IMVAVET). Ce vaccin protège contre les charbons bactériens et symptomatiques et l'entérite hivernale des bovins et ovins. Ces souches sont conservées dans une gélose molle dans la banque des souches à la température ambiante avec revivification périodique.

### Détermination de la DL<sub>100</sub>

La DL<sub>100</sub> est la dose létale minimale qui provoque la totalité des individus testés. Elle est 10 fois la dose létale de 50% (10 DL<sub>50</sub>). La détermination de cette dose est nécessaire pour le test de pathogénicité.

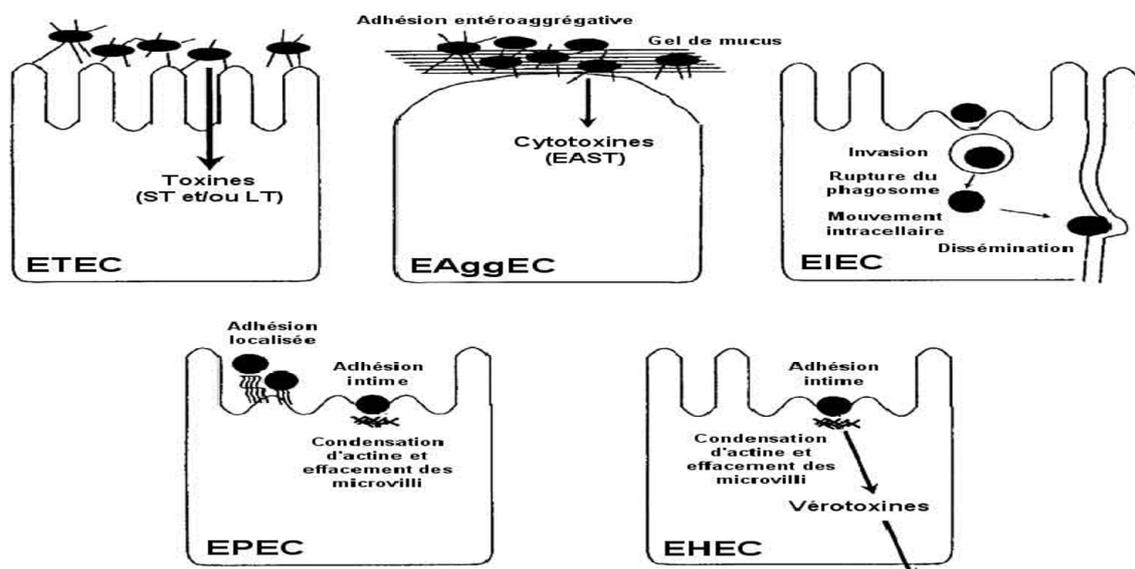


Figure 1: Schéma représentatif selon les caractéristiques d'*Escherichia coli* (Moulin *et al.*, 2019)

### Titration par la cellule de Malassez

Une culture de 18 h d'*Escherichia coli* issue de C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> dans un tube de prélèvement est titrée par le comptage dans une cellule de Malassez. Une série de 4 tubes 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup> contenant chacun 4,5 ml d'eau physiologique (chlorure de sodium: NaCl 9‰). Dans le premier tube (10<sup>-1</sup>) le 0,5 ml de culture est remplacé par du violet de Gentiane filtré au micro filtre de pores 0,2 µm de diamètre pour avoir ensuite le volume de 4,5 ml pour la dilution. La dilution en cascade est réalisée; 4,5 ml de la solution de violet de Gentiane est additionnée de 0,5 ml de la culture.

Après agitation du tube 10<sup>-2</sup>, 0,5 ml est prélevé et mis entre la lamelle la cellule de Malassez; et observé au microscope optique au grossissement fois 40. Le nombre de bactéries dans les carreaux 5x5 est compté. Le titre de la culture est donné par la formule:

$$N = n / (a \cdot v) \times Fd \quad (\text{Faurie 2019})$$

N: nombre de cellule par unité de volume

n: nombre de cellules comptées

a: nombre d'unité comptée

v: volume d'unité de comptage

Fd: facteur de dilution

Après le titrage, des dilutions en cascade dans une solution d'eau physiologique sont réalisées de manière à obtenir le nombre d'environ 100 bactéries pour l'ensemencement. 100 bactéries sont ensemencées dans les tubes et sont incubés à 37°C pendant une durée variable. Un prélèvement est réalisé toutes les heures à partir de 15 h jusqu'à 24 h.

### Détermination de la DL<sub>50</sub> (Hilan et al., 2009)

La DL<sub>50</sub> est la dose qui provoque 50% des individus testés. 4 lots de 3 souris blanches sont injectés par 0,5 ml de chaque dilution (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup>). On compte le nombre de morts et des survivants dans 24 h. Deux méthodes sont utilisées pour la détermination de la DL<sub>50</sub>:

- La méthode de Reed et Muench
- La méthode de Boyd

Par la méthode de Reed et Muench, la détermination de la DL<sub>50</sub> est donnée par la formule:

$$\log DL_{50} = \log B + ((0,5-N)/(M-N)) \times \log r \quad (\text{Reed et Muench, 1938})$$

B: dose immédiatement inférieure à DL<sub>50</sub>

N: mortalité provoquée par la dose B

M: mortalité provoquée par la dose immédiatement supérieure à la DL<sub>50</sub>

r: raison de progression géométrique

La détermination de la DL<sub>50</sub> par la méthode de Boyd est donnée par une droite à régression linéaire dont l'équation est de:

$$Y = A + B X \quad (\text{Boyd et al., 1966})$$

Y: pourcentage de mortalité

A: constante

B: coefficient de régression

X: log (dose)

La DL<sub>100</sub> est la concentration d'une solution à provoquer 100% de la population animale testée. C'est la dose d'épreuve, elle est 10 fois la DL<sub>50</sub>.

### Fabrication d'antigène

#### Contrôle des souches

A partir de la banque de souches, un piquage se fait à partir de la gélose molle et un ensemencement dans deux tubes contenant chacun 4,5 ml de tryptose liquide. Les deux tubes sont ensuite agités et incubés à 37 °C dans l'étuve pendant 2 h.

Après au minimum 2 h d'incubation, un étalement de la culture est fait sur deux boîtes de Pétri à gélose tryptose afin de tester la stérilité de la culture. Les boîtes sont incubées dans l'étuve à la même température.

A partir de 18 h d'incubation, la culture est prélevée et le prélèvement est coloré par la méthode de coloration Gram pour assurer la pureté de la culture. Les lames sont observées au microscope grossissement fois 100.

Seuls les tubes contenant les souches pures seront utilisés pour la production d'antigène.

#### Production d'antigène

##### Passage de culture

Les souches dans les tubes sont ensuite passées dans un erlenmeyer contenant un barreau magnétique et 50 ml de tryptose stérile. Cet erlenmeyer est muni d'un filtre à air et d'un système de tuyau pour un éventuel ensemencement dans le fermenteur.

Le volume d'ensemencement est toujours d'environ le dixième du volume à ensemencer pour permettre une bonne croissance des bactéries. A chaque passage un étalement sur gélose dans la boîte de Pétri et une incubation cette boîte sont obligatoires pour le contrôle de la stérilité. Le contenu de l'erlenmeyer est agité et incubé pendant environ 4 h dans l'étuve à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à ce que le milieu soit trouble.

##### Culture dans le fermenteur

Le fermenteur est un système de culture adapté pour permettre la multiplication en grande masse des bactéries. Il est équipé de différents tuyaux connectés les uns les autres et relié à deux pompes pilotées par un ordinateur par l'intermédiaire d'une interface: pompe à HCl et pompe à NaOH. Les deux pompes sont aussi reliées à deux flacons réservoirs d'HCl (N) et de NaOH (N). Chaque réservoir est muni d'un tuyau passant par sa pompe respective et atterrit dans la nacelle pour déverser leur contenu. Une pompe électrique fait entrer de l'air filtré dans la nacelle par un tuyau.

La nacelle est un grand flacon en verre où se trouve la majorité de la quantité de la culture. Elle contient un barreau magnétique et est plongée dans un bain mari régulé à 37°C et repose sur un agitateur magnétique pour permettre d'agiter son contenu. Dans la nacelle, il y a un tuyau de sortie et d'entrée du milieu de culture, ce tuyau passe par une autre pompe permettant de propulser le contenu de la nacelle dans le système de tuyau. Par cette pompe, le contenu de la nacelle passe dans les tuyaux, traverse une électrode reliée à l'ordinateur pour la mesure du pH, et circule dans un tuyau enroulé sur un panier métallique cylindrique dans un étuve régulé à 30°C pour une meilleure aération de la culture.

L'ordinateur contient un logiciel de réglage du pH qui augmente le pH par activation de la pompe NaOH ou diminue le pH par activation de la pompe HCl. Ce logiciel permet de régler le pH à environ 7,20.

Dans un lieu situé plus haut que la nacelle est placé un flacon contenant le milieu de culture stérile; relié à la nacelle par un tuyau muni d'une connexion en métal et d'une pince

pour régler la vitesse de coulage de ce milieu de culture. Le système est aussi muni d'un outil de prélèvement dans le but d'extraire une petite quantité de la culture pour la mesure périodique du pH et de la densité optique, un tuyau d'ensemencement et d'un tuyau de récolte.

**Ensemencement du fermenteur**

Le fermenteur et les connexions sont stérilisés à 121°C pendant 30 min. Environ 500 ml du milieu de culture est ajouté dans la nacelle et laissé avoir la température de 37°C. L'ensemencement du fermenteur se fait dans le tuyau d'ensemencement autour d'un feu du bec Bunsen. C'est le coulage du contenu de l'erlenmeyer vers le fermenteur. Il est suivi toujours d'un étalement de quelques gouttes de la culture sur une gélose dans la boîte de Pétri et d'une incubation dans l'étuve pour le test de stérilité.

**Fermentation**

La culture ensemencée passe dans le système de tuyau et arrive dans la nacelle, elle va être agitée et avoir la température optimale pour la croissance d'*Escherichia coli*. Propulsée par la pompe péristaltique, la culture suit le tuyau, traverse l'électrode qui va mesurer le pH, le transmettre dans l'ordinateur et ce dernier active l'une des pompe acide ou base pour avoir le pH environ 7,2. Elle circule dans le tuyau dans l'étuve pour une aération et retourne dans la nacelle pour avoir la température et le pH optimaux. Le circuit de déplacement est un circuit fermé.

Pendant la fermentation, un prélèvement est fait toutes les heures afin de mesurer la densité optique par un spectrophotomètre et de vérifier le pH par un pH-mètre hors du système de fermenteur. Cette fermentation dure 4 à 8 h. A un certain moment, la valeur de la densité optique n'augmente plus beaucoup, dans ce cas la période de prélèvement est réduite à 30 min pour suivre de près la croissance d'*Escherichia coli*.

**Récolte**

La courbe de la densité optique en fonction du temps est établie. Dans le cas où la valeur de la densité optique n'augmente plus considérablement, on s'apprête à faire la récolte. A l'obtention d'un plateau d'accroissement, la récolte est réalisée. La récolte est le ramassage de la culture dans un flacon de récolte stérile. Elle est toujours accompagnée d'un prélèvement de la culture dans deux ou trois tubes pour l'étalement sur boîtes et le titrage.

La récolte ainsi obtenue est formolée à 5% pour tuer les bactéries et agitée à la main, cette récolte formolée constitue l'antigène.

**Fabrication de vaccin prototype**

**Titration de l'antigène**

Les antigènes A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> ainsi obtenus respectivement à partir des souches C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> qui subissent ensuite une série de titrages. Le titrage consiste à déterminer le nombre de cellule par unité de volume. Le titrage adopté est le titrage par NPP (Nombre le Plus Probable). Il consiste à faire une dilution en cascade en 5 séries (A, B, C, D et E) de 12 tubes à essai contenant 4,5 ml de bouillon tryptose. Ces tubes sont numérotés de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-12</sup>. Dans chaque série, après agitation du prélèvement du tube de la récolte, 0,5 ml est ajouté dans le tube 10<sup>-1</sup>. Le tube 10<sup>-1</sup> est agité, 0,5 ml d'extrait du tube 10<sup>-1</sup> est transmis dans le tube 10<sup>-2</sup> et ainsi de suite jusqu'au tube 10<sup>-12</sup>. Ensuite, tous les tubes sont incubés à 37°C dans l'étuve. La lecture se fait après 24 h.

Après 24 h, le nombre de tubes des 3 dernières dilutions dans chaque série où il y a des poussées d'*Escherichia coli* est additionné et le NPP est donné par la table de Mac Grady (Tableau 1).

**Tableau 1: Indices de NPP par millilitre d'échantillons et limite de confiances à 95% avec 5 séries de tubes (Quebec, 2005)**

Combinaison de tubes	NPP/ml	Limite de confiance à 95 %		Combinaison de tubes	NPP/ml	Limite de confiance à 95 %	
		Inférieure	Supérieure			Inférieure	Supérieure
0-0-0	< 2	-	-	4-3-0	27	12	67
0-0-1	2	1,0	10	4-3-1	33	15	77
0-1-0	2	1,0	10	4-4-0	34	16	80
0-2-0	4	1,0	13				
1-0-0	2	1,0	11	5-0-0	23	9,0	86
1-0-1	4	1,0	15	5-0-1	30	10	110
1-1-0	4	1,0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-1	6	2,0	18	5-1-0	30	10	120
1-2-0	6	2,0	18	5-1-1	50	20	150
				5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1,0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2,0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2,0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3,0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3,0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5,0	29	5-3-2	140	60	360
				5-3-3	170	80	410
3-0-0	8	3,0	24	5-4-0	130	50	390
3-0-1	11	4,0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-0	11	4,0	29	5-4-2	220	100	580
3-1-1	14	6,0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-0	14	6,0	35	5-4-4	350	160	820
3-2-1	17	7,0	40				
4-0-0	13	5,0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7,0	45	5-5-1	300	100	1 300
4-1-0	17	7,0	46	5-5-2	500	200	2 000
4-1-1	21	9,0	55	5-5-3	900	300	2 900
4-1-2	26	12	63	5-5-4	1 600	600	5 300
4-2-0	22	9,0	56	5-5-5	≥ 1 600	-	-
4-2-1	26	12	65				

La formule de calcul du titre d'*Escherichia coli* est donnée par la relation du NPP dans la table de Mac Grady, le volume ensemencé et le facteur de dilution.

$$N = \text{NPP} / V \times \text{Fd} \quad (\text{Quebec, 2005})$$

N: nombre de cellules par ml; NPP: nombre le plus probable dans la table de Mac Grady; V: volume ensemencé; Fd: facteur de dilution

#### Composition du vaccin prototype

Le vaccin prototype est une composition de l'antigène et de l'adjuvant. L'adjuvant est une molécule naturelle ou synthétique capable d'induire une réponse immunitaire (Salem, 2010). Il est constitué de sulfate d'aluminium et de potassium (alun de potassium) à une concentration de 1,8%. Son pH est ajusté entre 6 à 7 (Rakotobe et al., 1989). Le vaccin prototype est l'ensemble de l'antigène d'*Escherichia coli* avec l'adjuvant formolé à 5%.

La formule est utilisée:  $V_i C_i = V_f C_f$

$V_i$ : volume de l'antigène à ajouter;  $C_i$ : concentration initiale qui est le titre de l'antigène à utiliser;  $V_f$ : volume final du prototype;  $C_f$ : concentration finale ou le titre du vaccin. Ainsi deux types de vaccin prototypes  $P_1$  et  $P_2$  sont obtenus.

#### Test d'activités des vaccins prototypes

16 souris de même taille sont divisées en 4 lots numérotés de 1 à 4. 4 lots de 4 souris sont vaccinés avec les deux prototypes de vaccin  $P_1$  et  $P_2$  obtenu respectivement avec deux types d'*Escherichia coli*  $C_1$  et  $C_2$ . Les souris dans le lot 1 et le lot 2 sont vaccinées avec le prototype  $P_1$ ; tandis que les souris du lot 3 et du lot 4 sont injectées avec le prototype  $P_2$ . Après 15 jours, de nouveau prototype de vaccin est injecté, c'est le rappel de la vaccination. Après une deuxième quinzaine, les souris vaccinées sont mises à l'épreuve. La moitié contenant 8 souris (4 vaccinés avec  $P_1$  et 4 vaccinés avec  $P_2$ ) est éprouvée avec une dose létale à 100% de  $C_1$  et l'autre moitié éprouvée avec celle de  $C_2$ . L'observation dure une semaine, et le nombre de souris mortes et survivantes est compté.

#### Durée de protection

4 lots de 5 souris ont reçu chacune 0,5 ml de prototype de vaccin  $P_1$  et 4 autres lots avec le même nombre de souris sont injectés avec  $P_2$  pour déterminer la durée de protection de chaque antigène. La même dose est injectée comme dose de rappel après 15 jours de la première injection.

Après 3 mois du rappel, le premier lot est mis à l'épreuve virulente: chaque souris a reçu 0,5 ml de la dose létale 100% ( $DL_{100}$ ). Deux souris non vaccinées servent de témoins et reçoivent chacun 0,5 ml de la  $DL_{100}$ . L'observation dure 24 h.

Les nombres de souris mortes et survivantes sont comptés.

#### Durée de conservation

Les prototypes  $P_1$  et  $P_2$  sont conservés au réfrigérateur à la température +4°C. La détermination de la durée de conservation des prototypes de vaccin consiste à les injecter à des souris de façon répétitive et d'éprouver les souris par la dose  $DL_{100}$ . 5 souris reçoivent 0,5 ml de prototype de vaccin puis 0,5 ml après 15 jours. Les 15 jours suivant, toutes les souris subissent l'épreuve virulente. Elles reçoivent chacun 0,5 ml de la dose  $DL_{100}$  et l'observation dure 24 h. Deux souris non vaccinées servent toujours de témoins, elles reçoivent chacun 0,5 ml de la  $DL_{100}$ . L'injection de 0,5 ml suivi du rappel de la même dose après 15 jours et l'épreuve après 15 jours du rappel sont répétés après 3, 6 et 9 mois. Les nombres de souris mortes et survivantes sont comptés.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Les milieux de culture

Le milieu de culture liquide obtenu doit être limpide, le milieu liquide trouble est décontaminé. Les géloses (gélose molle et gélose tryptose) doivent être dépourvues de colonie de bactéries, les géloses pourvues de colonie de bactéries sont détruits. Après l'incubation pendant 24 h, les milieux de culture qui ne présentent aucune poussée de bactérie seront utilisés.

### Les souches

Les souches vaccinales sont stockées dans une banque de souches à température ambiante pour une éventuelle utilisation. Ces souches nécessitent une revivification pour garder leur virulence car la conservation à une longue durée dans un milieu synthétique pourrait engendrer une perte de virulence des bactéries. La revivification a pour objectif de garder la virulence des souches. Pour cela leur inoculation dans la souris est l'un des moyens pour garder ou ramener la pathogénicité d'*Escherichia coli*.

Après la revivification des souches, elles doivent être identifiées car d'autres bactéries peuvent accidentellement les contaminer pendant l'inoculation ou pendant le prélèvement ou dans un moment inattendu. Ces intrus pourraient se multiplier avec les souches voulues pendant la manipulation. Dans ce cas, l'isolement par étalement ou par dilution en cascade est nécessaire pour la purification des bactéries.

Les souches pures sont ensuite stockées dans une gélose molle qui leur permet de vivre pendant des années à la température ambiante. Plusieurs modes de conservation sont déjà essayés comme la lyophilisation avec du lait écrémé, la congélation à -20°C avec le milieu de culture, la congélation avec la glycérine 30% et le froid à 4°C; mais la conservation dans la gélose molle à température de la salle permet à ces types d'*Escherichia coli* d'être vivants durant des années.

Dans ce mode de conservation, *Escherichia coli* peut effectuer plus lentement toutes leurs réactions physiologiques car ce milieu contient la majorité des éléments nutritifs dont il a besoin mais seul la température et le pH ne leur sont pas optimaux.

### Comptage des cellules $C_1$

Après 24 h de culture, dans la cellule de Malassez, 6 champs où le nombre de bactéries est compté sont observés au grossissement fois 40 à une dilution  $10^{-3}$ . Le résultat est résumé dans le tableau 2.

### Calcul du titre $C_1$

Le nombre de bactéries par unité de volume est calculé de manière suivante:

$$N = (9+7+14+13+17+10) / (6 \times 0,00001) \times 1000 = 1,17 \times 10^9 \text{ UFC/ml}$$

**Tableau 2: Résultat du comptage de bactéries  $C_1$  sur cellule de Malassez**

Numéro du champ de comptage	Nombre de cellules comptées
1	9
2	7
3	14
4	13
5	17
6	10

**Variation du titre avec la durée d'incubation de C<sub>1</sub>**

Dans 1 ml de C<sub>1</sub>, il y a 117 x 10<sup>7</sup> bactéries, pour avoir les 100 bactéries à ensemercer, C<sub>1</sub> est dilué à 10<sup>-7</sup>. Dans la dilution de 10<sup>-7</sup>, 1 ml contient 117 bactéries donc,

**N = 0,8547 ml ou 854,7 µl contient 100 bactéries de C<sub>1</sub>**  
 100 bactéries environ sont ensemençées dans un tube de prélèvement pour donner, après une variation du temps d'incubation de la culture, le résultat du tableau 3 et figure 2.

**Comptage des cellules C<sub>2</sub>**

7 champs sont comptés au grossissement fois 40 dans la cellule de Malassez après une culture de 24 h de C<sub>2</sub> dans 4,5 ml de tryptose liquide à la dilution 10<sup>-2</sup>. Le résultat est dans le tableau 4.

**Calcul du titre C<sub>2</sub>**

Le nombre de bactéries par millilitre de milieu est aussi donné par la relation:

$$N = (9+9+5+12+8+7+4) / (7 \times 0.00001) \times 100 = 7,71 \times 10^5 \text{ UFC/ml}$$

**Variation du titre avec la durée d'incubation**

La souche C<sub>2</sub> à un titre de 771 x 10<sup>3</sup> bactéries/ml. Pour

**Tableau 4: Nombre de bactéries C<sub>2</sub> compté au microscope dans différents champs**

Numéro du champ de comptage	Nombre de cellules comptées
1	9
2	9
3	5
4	12
5	8
6	7
7	4

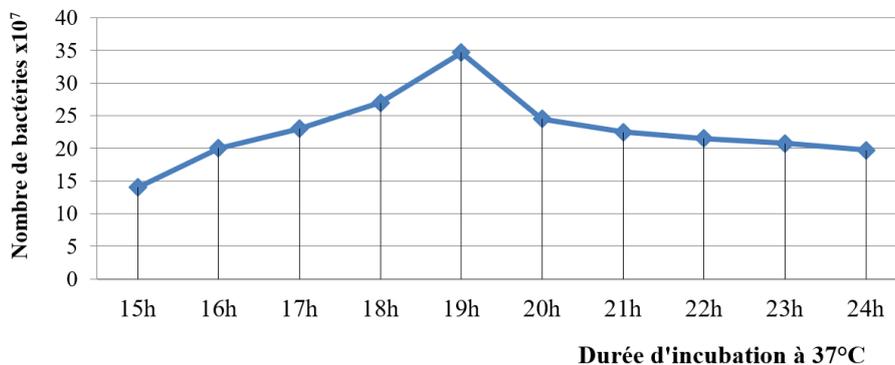
obtenir 100 bactéries pour l'ensemencement pour la détermination du nombre de bactéries par variation des temps d'incubation, la solution est diluée jusqu'à 10<sup>-3</sup> dans une solution de tryptose.

**NC<sub>2</sub> = 0,1297 ml ou 129,7 µl de C<sub>2</sub> contient 100 bactéries**

129,7 µl de solution de C<sub>2</sub> contenant 100 bactéries sont ensemençées dans 4,5 ml de tryptose liquide. Le nombre de bactéries après la variation de la durée du temps d'incubation est résumé dans le tableau 5 et figure 3.

**Tableau 3: Nombre de bactéries C<sub>1</sub> comptées en fonction de la durée d'incubation**

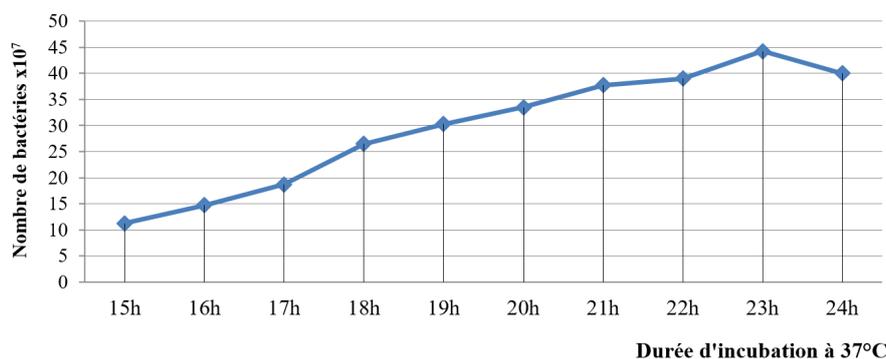
Durée d'incubation à 37°C	15 h	16 h	17 h	18 h	19 h	20 h	21 h	22 h	23 h	24 h
Nombre de bactéries dans le champ n°1	9	13	25	32	19	22	24	21	19	20
Nombre de bactéries dans le champ n°2	16	16	22	31	34	19	20	26	26	23
Nombre de bactéries dans le champ n°3	16	22	24	24	42	26	21	20	17	16
Nombre de bactéries dans le champ n°4	15	29	21	24	44	31	25	19	21	20
Titre (UFC/ml)	14×10 <sup>7</sup>	20×10 <sup>7</sup>	23×10 <sup>7</sup>	27×10 <sup>7</sup>	34,7×10 <sup>7</sup>	24,5×10 <sup>7</sup>	22,5×10 <sup>7</sup>	21,5×10 <sup>7</sup>	20,7×10 <sup>7</sup>	19,7×10 <sup>7</sup>



**Figure 2: Courbe de croissance de bactéries C<sub>1</sub>**

**Tableau 5: Nombre de bactéries C<sub>2</sub> comptées en fonction de la durée d'incubation**

Durée d'incubation à 37°C	15 h	16 h	17 h	18 h	19 h	20 h	21 h	22 h	23 h	24 h
Nombre de bactéries dans le champ n°1	12	11	14	30	26	27	28	25	28	22
Nombre de bactéries dans le champ n°2	11	16	18	32	30	28	47	39	44	29
Nombre de bactéries dans le champ n°3	15	14	24	23	28	31	35	49	55	64
Nombre de bactéries dans le champ n°4	7	18	19	41	37	48	41	43	50	45
Titre (UFC/ml)	11,2×10 <sup>7</sup>	14,7×10 <sup>7</sup>	18,7×10 <sup>7</sup>	26,5×10 <sup>7</sup>	30,2×10 <sup>7</sup>	33,5×10 <sup>7</sup>	37,7×10 <sup>7</sup>	39×10 <sup>7</sup>	44,2×10 <sup>7</sup>	40×10 <sup>7</sup>



**Figure 3: Courbe de croissance de bactéries C<sub>2</sub>**

Le titre de bactéries peut être variable car il s'agit d'une expérience biologique, mais ce titre est une moyenne présentant des valeurs proches. Dans le milieu tryptose liquide de 4,5 ml à 37°C, la croissance d'*Escherichia coli* C<sub>1</sub> atteint son pic à environ 19 h tandis que celle de C<sub>2</sub> st environ de 23 h. La croissance de C<sub>1</sub> est plus rapide que celle de C<sub>2</sub> mais C<sub>2</sub> présente un pic 10 fois plus nombreux que C<sub>1</sub>. Pour la suite de l'étude, l'incubation de C<sub>1</sub> sera toujours à 19 h. La connaissance de ces pics est utile pour l'incubation de chaque bactérie. Les résultats sont résumés dans le tableau 6.

### Pathogénicité des souches

Les souris qui ont reçu 0,5 ml de chaque souche C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> sont toutes mortes par diarrhée après 24 h. La dissection de leur cadavre montre une abondance d'eau dans l'intestin.

La récupération des souches injectées montre encore beaucoup de bactéries après l'ensemencement et l'incubation dans l'étuve pendant 24 h. Seules les bactéries qui ont les caractéristiques d'*Escherichia coli* (bacille mobile et Gram négatif) sont gardées et isolées.

### Identification

Les deux souches C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> étudiées sont des bacilles à Gram négatif. Elles sont colorées en rouge après une coloration de Gram. Les séries de caractérisation biochimique sont données par le tableau 7.

### Valeur de la DL<sub>100</sub>

Après la dilution en cascade de C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> titrés, le DL<sub>50</sub> est respectivement obtenu par l'intersection des totaux cumulatif des souris mortes et les totaux cumulatifs des survivants.

### La souche C<sub>1</sub>

L'injection de 0,5 ml de la souche à différente dilution de dose de C<sub>1</sub> est donnée par le tableau 8.

**Tableau 7: Résultat des tests de caractères biochimiques des souches C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub>**

Test	Résultats C <sub>1</sub>	Résultats C <sub>2</sub>
Arabinose	+	+
Bouillon bilié	+	+
Bouillon nitraté	+	+
Citrate de Simons		
Dulcitol		
Eau de levure	+	+
Eau peptonée	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Gaz	+	+
Glucose	+	+
GRAM		
Indole		
Lactose	+	+
LDC	+	+
Mannitol	+	+
Mobilité	+	+
ODC	+	+
ONPG	+	+
Saccharose	+	+
Salicine	+	+
Tréhalose	+	+
Urée		
Xylose	+	+

(+): Réduction des substrats; ( ): Substrats inchangés

**Tableau 6: Titre de la solution bactérienne en fonction du temps**

Souche	Nombre de bactéries ensemencées dans 4,5 ml de milieu	Durée d'incubation à 37°C (h)	Titre dans 4,5 ml de milieu (bactéries/ml)
C <sub>1</sub>	100	15 h	14,0×10 <sup>7</sup>
		16 h	20,0×10 <sup>7</sup>
		17 h	23,0×10 <sup>7</sup>
		18 h	27,0×10 <sup>7</sup>
		19 h	34,7 ×10 <sup>7</sup>
		20 h	24,5×10 <sup>7</sup>
		21 h	22,5×10 <sup>7</sup>
		22 h	21,5×10 <sup>7</sup>
		23 h	20,7×10 <sup>7</sup>
		24 h	19,7×10 <sup>7</sup>
C <sub>2</sub>	100	15 h	11,2×10 <sup>7</sup>
		16 h	14,7×10 <sup>7</sup>
		17 h	18,7×10 <sup>7</sup>
		18 h	26,5×10 <sup>7</sup>
		19 h	30,25×10 <sup>7</sup>
		20 h	33,5×10 <sup>7</sup>
		21 h	37,7×10 <sup>7</sup>
		22 h	39,0×10 <sup>7</sup>
		23 h	44,2×10 <sup>7</sup>
		24 h	40,0×10 <sup>7</sup>

**Tableau 8: Résultat de l'injection de 0,5 ml de C<sub>1</sub> avec différentes dilutions**

Dilution	Nombre de bactéries dans 0,5 ml	Nombre de morts	Nombre de survivants	Taux de mortalité
10 <sup>0</sup>	34,7×10 <sup>7</sup>	3	0	100
10 <sup>-1</sup>	34,7×10 <sup>6</sup>	2	1	66,7
10 <sup>-2</sup>	34,7×10 <sup>5</sup>	1	2	33,3
10 <sup>-3</sup>	34,7×10 <sup>4</sup>	0	3	0
10 <sup>-4</sup>	34,7×10 <sup>3</sup>	0	3	0

Méthode de Reed et Muench

$$\log DL_{50}C_1 = \log 34,7 \times 10^5 + ((0,5-0,33)/(0,67-0,33)) \times \log 10$$

$$DL_{50}C_1 = 10,99 \times 10^6 \text{ bactéries/ml}$$

$$DL_{100}C_1 = 1,099 \times 10^8 \text{ bactéries/ml}$$

Méthode de Boyd

$$Y_1 = 33,3 X_1 - 184,6$$

Les courbes de nombre de souris mortes et vivantes par la souche C1 sont données par la figure 4.

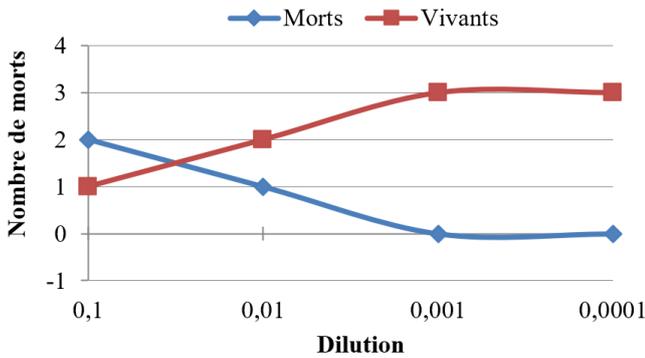


Figure 4: Courbes montrant l'intersection des courbes des totaux cumulatifs des morts et des survivants de la souche C<sub>1</sub>

La DL<sub>50</sub>C<sub>1</sub> pour C<sub>1</sub> est l'intersection des totaux cumulatifs des souris mortes et survivantes.

$$DL_{50}C_1 = ]34,7 \times 10^5 ; 34,7 \times 10^6[$$

$$DL_{100}C_1 = ]34,7 \times 10^6 ; 34,7 \times 10^7[$$

La souche C<sub>2</sub>

Les résultats de la DL<sub>50</sub> de C<sub>2</sub> sont résumés dans le tableau 9. Pour la souche C<sub>2</sub>, la DL<sub>50</sub> se situe dans les dilutions de 10<sup>-1</sup> et 10<sup>-2</sup>, la DL<sub>100</sub> est 10 fois la DL<sub>50</sub>. Le nombre de bactéries injecté pour l'épreuve est de:

Méthode de Reed et Muench

$$\log DL_{50}C_2 = \log 9,35 \times 10^5 + \times \log 10$$

$$DL_{50}C_2 = 1,66 \times 10^6 \text{ bactéries/ml}$$

$$DL_{100}C_2 = 1,66 \times 10^7 \text{ bactéries/ml}$$

Tableau 9: Résultat de l'injection de 0,5 ml de C<sub>2</sub> avec différentes dilutions

Dilution	Nombre de bactéries dans 0,5 ml	Nombre de morts	Nombre de survivants	Taux de mortalité
10 <sup>-1</sup>	9,35 × 10 <sup>6</sup>	3	0	100
10 <sup>-2</sup>	9,35 × 10 <sup>5</sup>	1	2	33,3
10 <sup>-3</sup>	9,35 × 10 <sup>4</sup>	1	2	33,3
10 <sup>-4</sup>	9,35 × 10 <sup>3</sup>	0	3	0

Tableau 10: Comptage des 3 derniers tubes de la dilution où il existe de la croissance d'*Escherichia coli* C<sub>1</sub> pour l'antigène A<sub>1</sub>

Tube	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-11</sup>	10 <sup>-12</sup>
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Nombre de tube									5	3	3	

(+): il y a croissance d'*Escherichia coli* C<sub>p</sub>, () : pas de croissance d'*Escherichia coli* C<sub>p</sub>

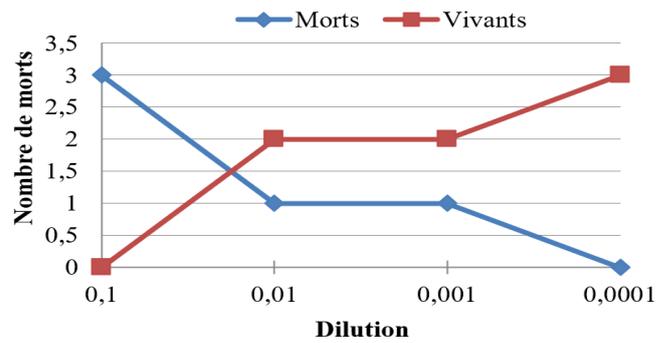


Figure 5: Courbes montrant l'intersection des courbes des totaux cumulatifs des morts et des survivants de la souche C<sub>2</sub>

Méthode de Boyd

$$Y = 66,7 X - 364,7$$

Les courbes de nombre de souris mortes et vivantes par la souche C<sub>2</sub> sont données par la figure 5.

La DL<sub>50</sub>C<sub>2</sub> est donnée par l'intersection des courbes des totaux cumulatifs des souris mortes et survivantes.

$$DL_{50}C_2 = ]9,35 \times 10^5 ; 9,35 \times 10^6[$$

$$DL_{100}C_2 = ]9,35 \times 10^5 ; 9,35 \times 10^6[$$

La souche C<sub>2</sub> est plus pathogène que C<sub>1</sub>, sa DL<sub>100</sub> qui est de 1,66 × 10<sup>7</sup> bactéries/ml est plus petite que celle de C<sub>1</sub> dont la DL<sub>100</sub> est de 1,09 × 10<sup>8</sup> bactéries/ml.

Titre des antigènes par MPN

Après l'incubation, la dilution en cascade des 5 séries de tube A, B, C, D et E, le nombre de tube des 3 dernières dilutions où il y a croissance d'*Escherichia coli* est donné par les tableaux 10 et 11.

Le titre N<sub>1</sub> d'*Escherichia coli* C<sub>1</sub> est donné par la méthode de Mac Grady:

$$N_1 = NPP/V \times Fd = (170/0,5) \times 10^9 = 3,410 \text{ UFC /ml}$$

Le titre probable de la souche C<sub>2</sub> est calculé par la méthode de Mac Grady:

$$N_2 = NPP/V \times Fd = (220/0,5) \times 10^9 = 4,410 \text{ UFC/ml}$$

Après la fermentation, 5000 ml de chaque solution de  $C_1$  et de  $C_2$  est récolté. Le titre de ce 5000 ml de récolte de  $C_1$  et  $C_2$  est respectivement de 3,410 UFC /ml et de =4,410 UFC/ml. Chaque récolte est additionnée de 5 ml de formol pour inactiver les bactéries. Les solutions formolées ainsi obtenues constituent les antigènes  $A_1$  et  $A_2$ . Ces antigènes entrent dans la confection des vaccins prototypes  $P_1$  et  $P_2$ .

### Titre du vaccin prototype

Le vaccin prototype est la composition de l'antigène avec l'adjuvant aluné pour atteindre un titre de 5109 bactéries/ml.

Le titre du vaccin prototype  $P_1$  est:

$$V_{i1} = (2000 \times 5 \times 10^9) / (3,4 \times 10^{11}) = 29,4 \text{ ml de } P_1$$

Le titre du vaccin prototype  $P_2$  est:

$$V_{i2} = (2000 \times 5 \times 10^9) / (4,4 \times 10^{11}) = 22,7 \text{ ml de } P_2$$

Pour atteindre le titre de 5109 bactéries/ml dans une quantité de 2000 ml, 29,41 ml d'antigène  $A_1$  de titre initial de 3,410 bactéries/ml est additionné dans 2000 ml d'adjuvant préalablement préparé. D'autre part, 22,7 ml d'antigène  $A_2$  de titre initial 4,410 UFC/ml est introduit dans 2000 ml d'adjuvant stérile.

### Test de l'efficacité

Après l'épreuve virulente, le nombre de souris mortes et survivantes pendant le test d'efficacité des vaccins prototypes  $P_1$  et  $P_2$  est donné par le tableau 12.

L'administration de 0,5 ml de chaque prototype de vaccin et la même dose de rappel après 15 jours par voie sous-cutanée des vaccins prototypes sur la souris blanche ne montre aucune lésion et aucune mortalité pour toutes les souris vaccinées. Elles sont observées chaque jour pour le suivi de leur état de santé.

L'épreuve est réalisée 15 jours après l'injection de la dose de rappel. Les souris vaccinées par  $P_1$  qui ont reçu la  $DL_{100}$  de  $C_1$  survivent pendant le temps d'observation de 10 jours. Par contre, les souris vaccinées avec  $P_1$  n'ont pas survécu à l'injection de la  $DL_{100}$  de la souche  $C_2$ . Vice-versa, les souris vaccinées avec  $P_2$  résistent à la  $DL_{100}$  de  $C_2$  et sont mortes à l'injection de la  $DL_{100}$  de  $C_1$ . L'antigène de la souche  $C_1$  est différent de celui de la souche  $C_2$ .

L'injection de chaque antigène obtenue à partir des deux souches  $C_1$  et  $C_2$  ne montre aucune lésion ni mortalité. Vu que l'antigène respectif obtenu est un entier corps bactérien inactivé par le formol à 5%, il est entièrement inactivé et la quantité de formol (5%) pour conserver le corps bactérien n'est pas toxique pour les souris.

La première dose de vaccin prototype permet l'activation des anticorps pour anéantir les antigènes injectés lors de la primo-vaccination. Après environ 15 jours, la production des anticorps est estimée maximale. Lors de la deuxième dose, l'antigène lors de la première dose est mémorisé par les anticorps, la nouvelle apparition de ce même antigène permet l'augmentation de la production de nouveau anticorps de même type; c'est l'importance de l'injection de la dose de rappel dans la vaccination.

L'antigène obtenu à partir de la souche  $C_1$  entraîne une production d'anticorps contre la souche  $C_1$ , mais l'anticorps produit par cet antigène ne protège pas la souche  $C_2$  et vice-versa. Les souches  $C_1$  et  $C_2$  ne présentent donc pas le même antigène car il n'y a pas de protection croisée.

Auparavant, la détermination de la dose d'épreuve se fait par une injection de la dilution en cascade des souches à approuver. Le nombre de bactéries contenues dans une même dilution est variable pour une même souche car la multiplication des *Escherichia coli* dépend de beaucoup de paramètres: le nombre de bactériesensemencées, les comportements des bactéries avant l'ensemencement et les différents modes de conservation. C'est une expérience biologique qui pourrait changer au cours des temps. Ainsi, le temps d'incubation des *Escherichia coli* est estimé à 18 à 20 h. Dans cette expérience, la détermination de la  $DL_{100}$  est basée sur le nombre de bactéries par millilitre de milieu, ce qui donne une précision pour la dose d'épreuve. Le temps d'incubation des deux souches est décalé d'une heure. La souche  $C_1$  a un temps d'incubation plus long pour avoir le maximum de concentration, tandis que la souche  $C_2$  se multiplie rapidement et présente une faible concentration par rapport à  $C_1$  dans un milieu de culture non renouvelable. Pourtant, la souche  $C_2$  est plus pathogène que  $C_1$ , le nombre pour tuer 100% de la souris testée n'est que  $16,6 \times 10^6$  bactéries/ml contre  $10,9 \times 10^7$  bactéries/ml pour la souche  $C_1$ . Cette pathogénicité de la souche  $C_2$  pourrait

**Tableau 11: Comptage des 3 derniers tubes de la dilution où existe la croissance d'*Escherichia coli*  $C_2$  pour l'antigène  $A_2$**

Tube	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$	$10^{-11}$	$10^{-12}$
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Nombre de tube									5	4	2	

(+): il y a croissance d'*Escherichia coli*  $C_2$ ; (0): pas de croissance d'*Escherichia coli*  $C_2$

**Tableau 12: Récapitulation des tests d'efficacité des prototypes vaccinaux**

Souches d'épreuve	Souris témoins	Nombre total de souris vaccinées testées	Nombre de souris vaccinées		Nombre de souris mortes			Nombre de souris vivants		Pourcentage de protection	
			$P_1$	$P_2$	$P_1$	$P_2$	Témoins	$P_1$	$P_2$	$P_1$	$P_2$
$C_1$	2	8	4	4	0	4	2	4	0	100%	0%
$C_2$	2	8	4	4	4	0	2	0	4	0%	100%

$C_1$ : souche d'épreuve  $C_1$ ;  $C_2$ : souche d'épreuve  $C_2$ ;  $P_1$ : vaccin prototype issu de  $C_1$ ;  $P_2$ : vaccin prototype issu de  $C_2$ ; T: souris témoins

être due à sa rapidité de se multiplier et elle colonise rapidement la surface d'infection provoquant ainsi la mort de l'individu infecté.

L'antigène produit avec la souche C<sub>1</sub> n'entraîne pas la protection de la souche C<sub>2</sub> et vice-versa. Les 2 souches ne possèdent pas les mêmes antigènes. Chaque antigène produit protège le cobaye pendant 12 mois environ. Au-delà de ce délai, le taux de protection contre chacun de ces souches diminue considérablement. Le vaccin produit à partir de ces 2 souches est conservé pendant 6 mois environ à 4°C pour pouvoir garder le taux de protection supérieur à 80%. Ceci est dû à la dégradation successive de l'antigène qui est une protéine thermolabile.

**Durée de protection**

Après les épreuves successives périodiques de 3, 6, 9 et 12 mois sur les souris vaccinées par les prototypes de vaccin P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub>, le nombre de souris mortes et survivantes est donné par le tableau 13. Chaque épreuve est réalisée en présence des 2 souris témoins non vaccinées; toutes les souris servant de témoins sont mortes.

**Durée de conservation**

Les prototypes de vaccins sont conservés à 4°C dans un réfrigérateur. Leur efficacité est testée dans un intervalle de 3 mois (3, 6, 9 mois). Les 2 souris non vaccinées servant de témoins pour chaque épreuve sont toutes mortes. Le nombre de souris vaccinées mortes et survivantes après l'épreuve est donné par le tableau 14. A 3 mois, le taux de protection de du vaccin est maximal. Il diminue progressivement avec le temps. Après 6 mois de conservation à 4°C, le taux de protection de 80% est encore tolérable. Au-delà de ce limite, l'utilisation du vaccin est déconseillée.

**CONCLUSION**

La santé animale, surtout des bovins, n'est pas toujours priorisée à Madagascar. Les données concernant ce domaine sont insuffisantes ou limitées. A notre connaissance, les études concernant la santé des bovins sont encore rares. Pourtant, la santé des bovins est indispensable pour la société afin de maîtriser les maladies affectant ces espèces du fait que le bétail est toujours en contact avec l'homme. Cette étude a permis d'apporter des connaissances sur l'une des luttes contre les maladies bovines à Madagascar et d'initier d'autres voies pour l'amélioration de l'élevage des bovins. L'antigène produit à partir de 2 souches est introduit dans la fabrication de vaccins contre la colibacillose afin d'élargir le taux d'efficacité du vaccin contre la colibacillose bovine. L'introduction d'autres types d'antigène pour renforcer le taux de protection des vaccins produits s'avère nécessaire afin d'améliorer cette protection.

**RÉFÉRENCES**

Anonyme. Prévenir et réduire les mammites en élevage laitier. <https://les-mammites-j-anticipe.com/informations/qu-est-ce-qu-une-mammite/>.

Balière, C. (2016). Les *Escherichia coli* potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral: cas des STEC et des EPEC. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne occidentale - Brest, 179p.

Boyd, E.M., D. Michael, M. Abel (1966). The acute toxicity of barium sulfate administered intragastrically. *Can. Med. Assoc. J.*, 94: 849-853.

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (2005). Dénombrement de *Escherichia coli*: méthode par tubes multiples employant un milieu de culture à substrats enzymatiques. MA. 700-Ec-tm 1.0, Rév. 1, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec: 19 p.

**Tableau 13: Durée de protection des vaccins prototypes**

Vaccin prototype	Nombre de souris testées	Nombre de souris vaccinées mortes après le test				Nombre de souris survivantes après le test				Pourcentage de protection			
		3 mois	6 mois	9 mois	12 mois	3 mois	6 mois	9 mois	12 mois	3 mois	6 mois	9 mois	12 mois
P <sub>1</sub>	5	0	0	0	1	5	5	5	4	100%	100%	100%	80%
P <sub>2</sub>	5	0	0	0	0	5	5	5	5	100%	100%	100%	100%

**Tableau 14: Durée de conservation des vaccins prototypes à 4°C**

Vaccin prototype	Nombre de souris testées	Nombre de souris mortes après le test			Nombre de souris survivantes après le test			Pourcentage de protection		
		3 mois	6 mois	9 mois	3 mois	6 mois	9 mois	3 mois	6 mois	9 mois
P <sub>1</sub>	5	0	1	3	5	4	2	100%	80%	40%
P <sub>2</sub>	5	0	1	4	5	4	1	100%	80%	20%

- Faurie, B. (2019). Cellule de Malassez. [https://www.researchgate.net/publication/331906916\\_Cellule\\_de\\_Malassez](https://www.researchgate.net/publication/331906916_Cellule_de_Malassez)
- Filion, R. (1948). Étude des Mammites Bovines. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 12: 301-305.
- Hilan, C., D. Bouaoun, J. Aoun, R. Sfeir, F. Garabeth (2009). Propriétés antimicrobiennes et toxicité par détermination de la DL50 de l'huile essentielle de Prangos asperula Boissier. *Phytothérapie*, 7: 8-14.
- Jauréguy, F. (2009). Déterminants cliniques et bactériens au cours des infections extra-intestinales dues à *Escherichia coli*. *Med. Sci. (Paris)*, 25: 221-223.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, H. L. T. Mobley (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 123-140.
- Khellafi, A., A. Samer, L. Aboura, L.E. Boussouf (2009). La résistance bactérienne aux bêta-lactamines, Université de Jijel. 40p.
- Ma, Z., A. Ginn, M. Kang, K. N. Galvão, K.C. Jeong (2018). Genomic and virulence characterization of intrauterine pathogenic *Escherichia coli* with multi-drug resistance isolated from cow uteri with metritis. *Frontiers in Microbiol.*, 9: 3137.
- Maris, S. (2016). Caractérisation de souches d'*Escherichia coli* pathogènes urinaires provenant de Guadeloupe: portrait de la diversité des facteurs de virulence présents. Mémoire présentée pour l'obtention du M.Sc. en Microbiologie Appliquée. Université du Québec, 99p.
- Moulin, S., B. Légeret, S. Blangy, D. Sorigué, A. Burlacot, P. Auroy, Y. Li-Beisson, G. Peltier, F. Beisson. (2019). Continuous photoproduction of hydrocarbon drop-in fuel by microbial cell factories. *Scientific Reports*, 9: 13713.
- Plotkin, S. (2014). History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111: 12283-12287.
- Rakotobe, F., J.J. Rajaonarison, R. Randriamihamina, E. Randrianasolo, H.V. Rafaliarisoa (1989). Progrès technologiques réalisés de 1987 à 1989 pour la production des vaccins bactériens. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 54: 183-186.
- Rakotovoao-Ravahatra, Z.D., F.M. Randriatsarafara, S. Rasoa-nandrasana, L. Raverohanta, A.L. Rakotovoao (2017). Resistant phenotypes of *Escherichia coli* strains responsible for urinary tract infection in the laboratory of the University Hospital Joseph Raseta Befelatanana, Antananarivo. *The Pan African medical journal*, 26: 166-166.
- Ramilitiana, B., R.A. Rakotoarivelo, S.H. Razafimahefa, D. Vololontiana, A. Randrianarison, M.J.D. Randria, W.F.H. Randriamarotia (2014). Prévalence de la résistance des bactéries aux antibiotiques dans les infections urinaires de l'adulte en milieu hospitalier à Antananarivo. *Médecine d'Afrique Noire*, 6110: 514-518.
- Reed, L., H.A. Muench (1938). Simple method of fifty percent points. *Am. J. Hyg.*, 27: 293.
- Rycke, J.D. (1991). Les colibacilles producteurs de cytotoxines: importance en médecine vétérinaire et en santé publique. *Ann. Rech. Vét.*, 22: 105-126.
- Salem (2010). Propriétés des antigènes. <https://www.letemps.ch/sites/default/files/media/2014/02/18/2.1.2863377880.pdf>.
- Sandrine, C. (2021). Les colibacilloses des bovins. <https://cdn-media.eurofins.com/european-west/media/12151566/les-colibacilloses-bovins.pdf>.
- Ultra, E. (2020). Colibacillose. [https://fac.umc.edu.dz/vet/Cours\\_Ligne/Cours/Infectieux/ColibacilosEscherichiapdf](https://fac.umc.edu.dz/vet/Cours_Ligne/Cours/Infectieux/ColibacilosEscherichiapdf).
- Vaillant, A.A.J., M.J. Grella (2022). Vaccin (Vaccination). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532895/>.