

# Tests d'activité du vaccin bivalent contre la colibacillose bovine sur *Escherichia coli* circulant

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 14/03/2025; Accepté le 10/05/2025)

## Résumé

L'objectif de cette étude est de déterminer l'activité du vaccin anti-colibacillose vis-à-vis des souches circulantes de coliformes. À partir des déjections de bovins, 16 prélèvements sont récoltés dans différentes régions de Madagascar. Ils contiennent 8 types de bactéries dont 7 souches sont des coliformes, notées F1, V1, V5, VH1D, VH2, A1 et A2. Après leur isolement, les coliformes sont injectés par voie intrapéritonéale aux cobayes adultes à des doses entre  $10^8$  à  $10^9$  UFC/ml. La plupart des souches sont pathogènes, seule la souche VH1 ne l'est pas à une concentration de  $1,21 \times 10^8$  UFC/ml. Les doses létales 50% de chaque souche sont déterminées par les méthodes de Reed et Muench, de Boyd et graphique; pour déterminer la dose létale 100% ou DL100. La DL100 est utilisée lors du test de l'activité du vaccin anti-colibacillose sur ces souches coliformes. À une dose comprise entre  $0,0093 \times 10^8$  à  $27,4 \times 10^8$  UFC/ml, le vaccin protège les cobayes contre les souches F1, V1, V5, VH1D et VH2. Par contre, il ne les protège pas contre les souches A1 et A2 aux doses entre  $0,51 \times 10^7$  à  $3,44 \times 10^8$  UFC/ml. Ces souches diffèrent par leur vitesse de croissance et leur pathogénicité.

**Mots clés:** Coliformes circulantes, DL<sub>100</sub>, activité, vaccin

## Activity tests of the bivalent vaccine against bovine colibacillosis on circulating *Escherichia coli*

### Abstract

The objective of this study is to determine the activity of an anti-colibacillosis vaccine against circulating coliform strains. From cattle droppings, 16 samples were collected in different regions of Madagascar. They contain 8 types of bacteria including 7 coliform strains, noted F1, V1, V5, VH1D, VH2, A1 and A2. After their isolation, the coliforms are injected intraperitoneally into adult guinea pigs at doses between  $10^8$  and  $10^9$  CFU/ml. Most strains are pathogenic, but only the VH1 strain is not at a concentration of  $1.21 \times 10^8$  CFU/ml. The 50% lethal doses of each strain are determined using Reed and Muench, Boyd and graph methods; to find the 100% lethal dose or LD100. The LD100 is used when testing the activity of the anti-colibacillosis vaccine on these coliform strains. At a dose ranging from  $0.0093 \times 10^8$  to  $27.4 \times 10^8$  CFU/ml, the vaccine protects guinea pigs against strains F1, V1, V5, VH1D and VH2. However, it does not protect them against strains A1 and A2 at doses between  $0.51 \times 10^7$  to  $3.44 \times 10^8$  CFU/ml. These strains differ in their growth rate and pathogenicity.

**Keywords:** Circulating strains, LD<sub>100</sub>, activity, vaccine

## INTRODUCTION

Les bovins et les autres ruminants constituent le réservoir le plus important d'*Escherichia coli* producteur de toxine zoonotique, transmise à l'homme par l'ingestion d'aliment ou d'eau contaminée par les déjections d'animaux, ou par contact direct avec les animaux infectés ou leur environnement (Fairbrother et Nadeau, 2006). *Escherichia coli* est l'un des principaux résidents du tractus intestinal de la plupart des espèces de mammifères (Fairbrother et Nadeau, 2006) et peut provoquer une maladie, la colibacillose. Parmi les colibacilloses, la colibacillose entérot toxique est l'une des quatre types de maladies causées chez les animaux par *E. coli* et ayant de lourdes conséquences sur le plan économique (OMS, 2008). Pour la protection de la vie des animaux et surtout celle de l'homme, une des stratégies visant à réduire le nombre de cas de cette maladie zoonotique est la vaccination. Le vaccin est un composé pharmacologique qui améliore l'immunité d'une personne ou d'un animal contre une maladie particulière; le système immunitaire reconnaît le matériel étranger en détectant des portions protéiques spécifiques ou antigènes (Ginglen et Doyle, 2024). L'antigène pourrait être des protéines, des peptides, des anatoxines ou du sérum; visant à stimuler la production d'un ou de plusieurs anticorps. Pourtant, différents groupes d'*E. coli* sont découverts selon la pathogénicité et les symptômes que la maladie provoque (Maris, 2016). Une des problématiques

de la vaccination est la diversité et le nombre élevé de type d'antigène que possède *E. coli*. Ce dernier possède différents types d'antigènes, trois antigènes de surface sont pris en compte: les antigènes O somatiques (171 au total), les antigènes K capsulaires (74) et enfin les antigènes H flagellaires (56) (Adingra et al., 2024). Cette étude apporte des connaissances sur l'activité du vaccin contre la colibacillose vis-à-vis des souches qui circulent dans la nature.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Milieu de culture

Deux types de milieux de culture ont été préparés, le milieu de Mac Conkey et le milieu tryptose.

### Milieu de Mac Conkey

Le milieu de Mac Conkey est un milieu sélectif pour l'isolement des entérobactéries. La présence du sel biliaire et du cristal violet provoque l'inhibition des bactéries à Gram positif; ces colorants inhibent principalement des entérocoques et des staphylocoques (Diassana, 2018).

50 g de poudre sont mis en suspension dans 1 litre d'eau distillée. Le contenu est agité et porté à ébullition jusqu'à la dissolution totale de la poudre. 4,5 ml de la solution est répartie pour chaque tube. Les tubes sont stérilisés à 121°C pendant 15 min. Ensuite, ils sont incubés à 37°C pendant une nuit pour un test de stérilité.

<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> Centre National de la Recherche Appliquée au Développement Rural (FOFIFA), Département de recherche Zootechnique Vétérinaire et Piscicole, Antananarivo, Madagascar

Pour la gélose, 50 g de poudre sont additionnés de 15 g d'agar; le tout est mis en suspension dans 1 litre d'eau distillée. Le milieu est stérilisé à 121°C pendant 15 min. Juste après l'autoclavage du milieu, le liquide est coulé stérilement en boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte. Les boîtes sont laissées refroidir jusqu'à la solidification de leur contenu. Les géloses ainsi obtenues sont incubées à 37°C.

### Milieu tryptose

Le tryptose est un milieu de culture pour les microorganismes exigeants (Néogène, 2020). Deux types de milieux peuvent être préparés: le milieu liquide et la gélose tryptose.

Pour le milieu liquide, 26 g de poudre sont dissous dans 1 litre d'eau distillée. La solution est répartie en tube à raison de 4,5 ml par tube. Les tubes sont stérilisés à 121°C pendant 15 min, puis ils sont incubés à 37°C pendant une nuit.

Pour la gélose, 26 g de poudre et de 15 g d'agar sont dissous dans 1 litre d'eau distillée. La solution est stérilisée à 121°C pendant 15 min puis coulée à chaud dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml environ par boîte. Les boîtes sont laissées refroidir jusqu'à la solidification du milieu. Elles sont incubées à 37°C pendant une nuit. Tous les milieux stériles sont conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure.

### Les souches

#### Mesures préventives d'hygiène et de sécurité

Lors des prises des échantillons, les produits à collecter doivent toujours être considérés comme potentiellement infectieux. Les prises des échantillons et les manipulations microbiologiques sont réalisées par du personnels ayant une formation académique en microbiologie. Les échantillons ou quelques parties des échantillons prélevés ne doivent pas contaminer l'environnement pendant le prélèvement, le transport et la manipulation, ils ne doivent se trouver qu'à l'endroit de destination, le laboratoire pour les tests. Les manipulations de cultures et des tests sont réalisés au laboratoire de niveau de confinement 3. Toutes les manipulations microbiologiques doivent impérativement être réalisées dans le poste de sécurité microbiologique ou PSM (Https 1). Seules les bactéries isolées qui s'avèrent utiles seront conservées pour une éventuelle manipulation. Tous les restes des échantillons avec les matériels de contenance et de prélèvement seront décontaminés à 121°C pendant 30 min après les tests.

#### Collecte des souches

Les souches sont prélevées dans 3 régions de Madagascar (Figure 1). Les souches à étudier ont été récoltées à partir de fèces de vache de 13 mois le 08 août 2022 à Soavina un petit village qui se trouve au Nord de Fandriana (Région au sud de la capitale). D'autres sont à partir de fèces de veau de 2 mois et 2 semaines le 30 juillet 2022 et le 30 décembre 2022 à Vohidiala qui est une commune rurale dans le district d'Ambatondrazaka (Région au Nord de la capitale); et à partir des matières fécales de chat et de poulet dans la périphérie d'Antananarivo le 27 août 2023. Elles ont été prises pendant la matinée. Ces matières fécales nouvellement éjectées ont été recueillies avec une cuillère en inox et mises dans les flacons, secs, en plastique, bouchonnés et préalablement lavés abondamment avec du savon. Une cuillère était récoltée pour chaque flacon. Chaque flacon est numéroté: F1 et F2 pour la vache de 13 mois de Fandriana, V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 pour la première récolte à Vohidiala et VH1

et VH2 pour la 2<sup>ème</sup> récolte de Vohidiala et A1 et A2 pour la récolte à Antananarivo. Le numéro est suivi de la date de récolte, le sexe et l'âge de l'animal. Les flacons, après la récolte, ont été bien bouchonnés et le bouchon est entouré de parafilm afin d'empêcher le contact de l'intérieur du flacon avec l'air extérieur. Les flacons ont été emballés dans du papier journal afin de minimiser l'échange de température du contenu du flacon avec celle de l'extérieur. Le tout a été mis dans un sac en plastique pour faciliter le transport.

À l'arrivée dans le laboratoire, le sac en plastique avec son contenu était placé au réfrigérateur à la température 4°C pendant la préparation des milieux de culture. Ces récoltes sont cultivées et isolées dans le laboratoire.

### Culture

La recherche des souches dans l'environnement nécessite un milieu sélectif des espèces bactériennes (Decousser *et al.*, 2023). La souche est cultivée dans 2 tubes de tryptose liquide et 2 autres tubes contenant de milieu liquide de Mac Conkey. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 2 h. Après 2 h, le contenu de chaque tube est étalé sur les géloses dans des boîtes de Pétri: la gélose tryptose et la gélose de Mac Conkey. Le tout est incubé à 37°C dans l'étuve pendant une nuit.

### Isolement

L'isolement des souches consiste à l'étalement successif de la souche sur une gélose dans la boîte de Pétri. La technique la plus habituelle est de faire une strie fine sur toute la surface de la gélose sans charger l'anse métallique. Les boîtes sont incubées à 37°C dans l'étuve pendant une nuit. Chaque étape de l'isolement et de la culture microbienne est terminée par des observations microscopiques; observations à l'état frais et après coloration Gram.



Figure 1: Régions de récolte des souches (Source: Https 2)

● : Lieu de récolte d'*E. coli*

### Identification et conservation

Les souches à identifier sont les *Escherichia coli*. L'identification commence par les observations microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram. Les souches isolées subissent des tests d'identification basés sur les caractères biochimiques. La souche est ensemencée dans différents substrats tels que l'arabinose, le bouillon bilié, le bouillon nitraté, le dulcitol, le citrate de Simmons, l'eau de levure, l'eau peptonée, le fructose, le galactose, le glucose, l'indole, le lactose, le test de LDC, le mannitol mobilité, le test de l'ODC, le saccharose, le test à l'ONPG, la salicine, le tréhalose, l'urée et la xylose (Clave, 2013). Les tubes sont incubés à 37°C pendant une nuit. Chaque souche pure d'*E. coli* est ensemencée dans 2 tubes à vis contenant de la gélose molle. Les tubes sont incubés dans l'étuve à 37°C pendant une nuit puis conservés dans une banque de souche à la température ambiante pour une éventuelle utilisation.

### Test de pathogénicité

Chaque souche pure obtenue est ensemencée dans un tube de prélèvement contenant 4,5 ml de milieu tryptose liquide. Le tube est incubé à 37°C dans l'étuve pendant 17 à 24 h environ. Chaque tube contenant du liquide trouble subit une dilution en cascade jusqu'à 10<sup>-3</sup> pour le titrage par la cellule de Malassez. Le nombre de bactéries par millilitre de liquide est compté. 1 ml de chaque culture est injecté par voie intrapéritonéale d'un cobaye. L'état de cobayes est observé (survivant, moribond ou mort), l'observation dure 24 h.

La DL<sub>100</sub> est la dose minimale provoquant la mortalité de 100% des individus testés (Saganuwan, 2011). Les souches sont diluées en cascade et 1 ml de chaque dilution est injectée aux cobayes par voie intra péritonéale. Le nombre de bactéries après chaque dilution et le nombre de cobayes morts et vivants sont comptés.

La DL<sub>100</sub> est la dose d'épreuve pour tester l'activité du vaccin ou de l'antigène vis-à-vis d'une souche donnée. Elle est une dose dix fois la dose qui provoque 50% des individus testés (DL<sub>50</sub>). Quatre lots de 3 cobayes sont injectés par 1 ml de chaque dilution (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup>). Le nombre de morts et de survivants en 24 h est compté. Trois méthodes sont utilisées pour la détermination de la DL<sub>50</sub>: la méthode d'intersection des courbes, la méthode de Reed et Muench et la méthode de Boyd.

La méthode d'intersection des courbes des animaux morts et survivants est une méthode de détermination de l'intervalle où se trouve la valeur de la DL<sub>50</sub>. C'est une intersection des courbes des totaux cumulatifs des animaux morts et survivants dans le test.

Par la méthode de Reed et Muench (1938) la détermination de la DL<sub>50</sub> est donnée par la formule:

$$\log DL_{50} = \log B + ((0,5-N)/(M-N)) \times \log r$$

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:

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

Y: pourcentage de mortalité, A: constante, B: coefficient de régression, X: log (dose)

### Optimisation du temps d'incubation

Une culture de 24 h dans l'étuve à 37°C des souches A1 et A2 dans 2 tubes contenant 5 ml de tryptose est titrée pour déterminer le nombre de souches par millilitre dans chaque tube.

Environ 100 bactéries de chaque type de souches (A1 ou A2) sont ensuite ensemencées dans 5 ml de tryptose liquide stérile; les tubes sont incubés à 37°C. 0,5 ml de chaque tube est prélevé toutes les heures pour le titrage à la cellule de Malassez (19 h, 20 h, 21 h, 22 h, 23 h). Le nombre d'*E. coli* est compté dans 4 champs différents et la moyenne est calculée.

### Activité du vaccin contre la colibacillose vis-à-vis des souches circulantes

Un vaccin contre la colibacillose est injecté par voie sous-cutanée à 21 cobayes. Chaque cobaye reçoit 1 ml de vaccin par injection sous-cutanée le 1<sup>er</sup> jour. Après 15 jours, la même dose de rappel est injectée sur chaque cobaye. Après 15 jours de l'injection de la dose de rappel, une dose de la DL<sub>100</sub> de chaque souche est injectée par voie intra péritonéale pour chaque cobaye vacciné, l'observation dure 10 jours.

## RÉSULTATS

### Récolte des souches

Dans les 16 prélèvements réalisés, après la coloration de Gram et l'observation au microscope optique grossissement fois 100 à l'état frais, 27 types de bactéries ont été observés. Parmi ces 27 types de bactéries seules les prélèvements: F1, V1, V5, VH1, VH1D, VH2, A1 et A2 présentent des bactéries en forme de bâtonnet, mobiles et à Gram<sup>-</sup>. Ils font l'objet pour la suite de l'isolement.

### Isolement

Seules les souches à Gram négatif ont été isolées pour la recherche des souches *E. coli*. Après isolement, les résultats sont présentés dans le tableau 1.

**Tableau 1: Caractères des bactéries à Gram négatif isolées**

Prélèvement	Mobilité	Forme	Taille	Bout	Observation
F <sub>1</sub>	Mobile	Bâtonnet	Grande	Arrondi	
V <sub>1</sub>	Mobile	Bâtonnet	Grande	Arrondi	
V <sub>5</sub>	Mobile	Bâtonnet	Fine	Arrondi	
VH <sub>1</sub>	Mobile	Bâtonnet	Très longue	Arrondi	Non coliforme rejeté
VH <sub>1D</sub>	Mobile	Bâtonnet	Grande	Arrondi	
VH <sub>2</sub>	Mobile	Bâtonnet	Grande	Arrondi	
A <sub>1</sub>	Mobile	Bâtonnet	Grande	Arrondi	
A <sub>2</sub>	Mobile	Bâtonnet	Grande	Arrondi	

### Identification

D'après les tests des caractères biochimiques des bactéries susceptibles d'être des *E. coli*, les résultats sont présentés par le tableau 2.

Les souches F1, V1, V5, VH1D, VH2, A1 et A2 sont conservées dans la gélose molle pour une éventuelle utilisation. D'après les résultats de l'observation microscopique, le prélèvement pour l'obtention des souches A1 et A2 ne présente qu'un seul type de bactérie, les souches A1 et A2 sont choisies pour la suite des études pour leur facilité de purification.

**Test de pathogénicité des *E. coli***

1 ml d'une culture de 20 h de chaque souche est injecté par voie intra péritonéale sur un cobaye. Le tableau 3 donne le résultat de l'innocuité après 24 h d'observation.

**Tableau 3: Nombre par millilitre de chaque souche injectée par voie intra péritonéale sur un cobaye**

Souches	Titre UFC/ml	Cobaye testé
F <sub>1</sub>	2,15×10 <sup>9</sup>	Mort
V <sub>1</sub>	2,35×10 <sup>9</sup>	Mort
V <sub>5</sub>	1,67×10 <sup>9</sup>	Mort
VH <sub>1</sub>	1,21×10 <sup>9</sup>	Survivant
VH <sub>10</sub>	1,57×10 <sup>9</sup>	Mort
VH <sub>2</sub>	4,00×10 <sup>9</sup>	Mort
A <sub>1</sub>	1,64×10 <sup>9</sup>	Mort
A <sub>2</sub>	1,09×10 <sup>9</sup>	Mort

La dose létale minimale 50% ou DL<sub>50</sub> de chaque souche est calculée par la méthode graphique, par la méthode de Reed et Muench et par la méthode de Boyd.

**La souche F1**

Une culture de 20 h de la souche F1 à 37°C dans un milieu liquide de tryptose donne un titre de 2,15×10<sup>9</sup> UFC/ml. Après une dilution en cascade, 1 ml de chaque dilution est injecté par voie intra péritonéale à un cobaye adulte. Le nombre de cobayes morts et survivants dans 24 h est représenté dans le tableau 4.

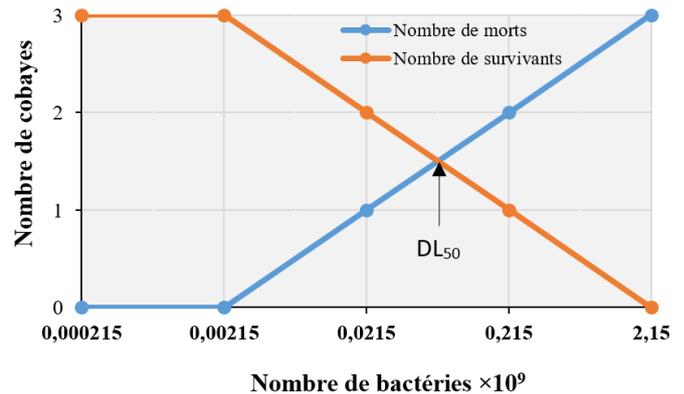
**Tableau 4: Nombre de cobaye mort et survivant en fonction du titre de F1**

Dilution	Titre UFC/ml	Nombre des morts	Nombre de survivants	Taux de mortalité
10 <sup>0</sup>	2,15×10 <sup>9</sup>	3	0	100
10 <sup>-1</sup>	2,15×10 <sup>8</sup>	2	1	66,7
10 <sup>-2</sup>	2,15×10 <sup>7</sup>	1	2	33,3
10 <sup>-3</sup>	2,15×10 <sup>6</sup>	0	3	0
10 <sup>-4</sup>	2,15×10 <sup>5</sup>	0	3	0

**Tableau 2: Représentation des caractères biochimiques des 7 souches coliformes**

Test	Résultats d' <i>E. coli</i>	F <sub>1</sub>	V <sub>1</sub>	V <sub>5</sub>	VH <sub>10</sub>	VH <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
A Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+
Bouillon bilié	+	+	+	+	+	+	+	+
Bouillon nitraté	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate de Simmons	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Eau de levure	+	+	+	+	+	+	+	+
Eau peptonée	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Gaz	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	+	+	+	+	+	+	+	+
Tréhalose	+	+	+	+	+	+	+	+
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+

La méthode graphique de détermination de la DL<sub>50</sub> de la souche F1 est représentée par la figure 2.



**Figure 2: Courbes de détermination de l'intervalle de la DL<sub>50</sub>**

La DL<sub>100</sub> de la souche F1 selon la méthode de Reed et Muench est calculée comme suit:

$$\log DL_{50} F1 = \log 2,15 \times 10^9 + ((0,5-0,33)) / ((0,66-0,33)) \log 10;$$

$$DL_{50} F1 = 0,704 \times 10^8, \text{ donc } DL_{100} F1 = 7,04 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

Par la méthode de Boyd, la DL<sub>100</sub> est déterminée comme suit: Y=33,3X-211; DL<sub>50</sub>=0,68×10<sup>8</sup>, donc DL<sub>100</sub>=6,8×10<sup>8</sup> UFC/ml

**La souche V1**

Une culture de 20 h dans un milieu tryptose liquide à 37°C de V1 donne un titre de 2,35×10<sup>9</sup> UFC/ml. L'injection de 1 ml de cette culture diluée en cascade par voie intra péritonéale sur un cobaye montre après 24 h le résultat représenté par le tableau 5.

**Tableau 5: Nombre de cobaye mort et survivant en fonction du titre de V1**

Dilution	Titre UFC/ml	Nombre de morts	Nombre de survivants	Taux de mortalité
10 <sup>0</sup>	2,35×10 <sup>9</sup>	3	0	100
10 <sup>-1</sup>	2,35×10 <sup>8</sup>	3	0	100
10 <sup>-2</sup>	2,35×10 <sup>7</sup>	1	2	33,3
10 <sup>-3</sup>	2,35×10 <sup>6</sup>	0	3	0
10 <sup>-4</sup>	2,35×10 <sup>5</sup>	0	3	0

La détermination de la DL<sub>50</sub> est donnée par la figure 3.

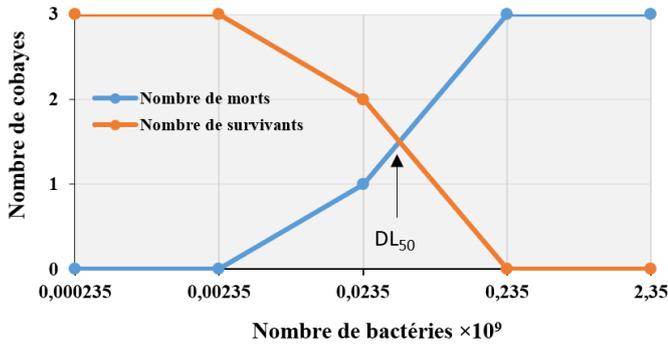


Figure 3: Courbes représentatives du nombre de cobayes morts et survivants par V1

La DL<sub>100</sub> de V1 est calculée comme suit selon la méthode de Reed et Muench:

$$\log DL_{50}V1 = \log 2,35 \times 10^7 + ((0,5-0,33))/((1-0,33)) \log 10,$$

$$DL_{50}V1 = 4,21 \times 10^7 \text{ UFC/ml, donc } DL_{100}V1 = 4,21 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

Par la méthode de Boyd, la DL<sub>100</sub> de V1 est:

$$Y = 66,7A - 458; DL_{50} = 4,17 \times 10^7 \text{ UFC/ml, donc } DL_{100}V1 = 4,17 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

**La souche V5**

La souche V5 cultivée à 37°C pendant 20 h dans le milieu tryptose liquide donne un titre de 1,67×10<sup>9</sup> UFC/ml. Après sa dilution, 1 ml de chaque dilution, injecté par voie intra péritonéale sur un cobaye donne après 24 h le résultat suivant (Tableau 6).

Tableau 6: Nombre de cobaye mort et survivant en fonction du titre de V5

Dilution	Titre UFC/ml	Nombre de morts	Nombre de survivants	Taux de mortalité
10 <sup>0</sup>	1,67×10 <sup>9</sup>	3	0	100
10 <sup>-1</sup>	1,67×10 <sup>8</sup>	2	1	66,7
10 <sup>-2</sup>	1,67×10 <sup>7</sup>	2	1	66,7
10 <sup>-3</sup>	1,67×10 <sup>6</sup>	0	3	0
10 <sup>-4</sup>	1,67×10 <sup>5</sup>	0	3	0

Le nombre de cobayes morts et survivants par la souche V5 est donné par la figure 4.

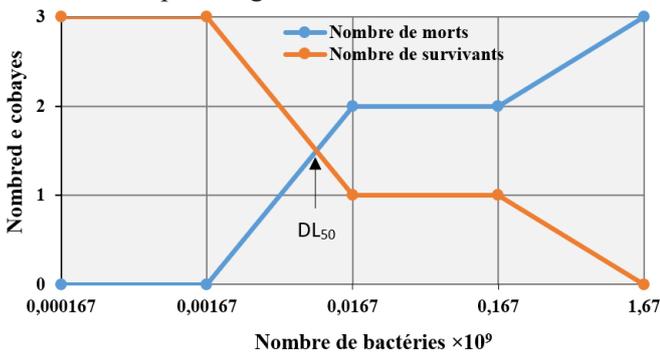


Figure 4: Courbes représentatives du nombre de cobayes morts et survivants par V5

D'après la méthode de Reed et Muench, la DL<sub>100</sub> de V5 est:

$$\log DL_{50}V5 = \log 1,67 \times 10^6 + ((0,5-0))/((0,66-0)) \log 10;$$

$$DL_{50}V5 = 9,55 \times 10^6 \text{ UFC/ml, donc } DL_{100}V5 = 0,095 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

Selon la méthode de Boyd, la DL<sub>100</sub> de V5 est:

$$Y = 66,7X - 414,6; DL_{50}V5 = 9,33 \times 10^6 \text{ UFC/ml, donc } DL_{100}V5 = 0,093 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

**La souche VH1D**

Après une culture de 20 h à 37°C de la souche VH1D dans un milieu tryptose liquide, le titre de la culture est de 1,57×10<sup>9</sup> UFC/ml; 1 ml de chaque dilution en cascade est administré par voie intrapéritonéale à un cobaye. Le nombre des morts et de survivants dans les 24 h est résumé dans le tableau 7.

Tableau 7: Nombre de cobaye mort et survivant en fonction du titre de VH1D

Dilution	Titre UFC/ml	Nombre de morts	Nombre de survivants	Taux de mortalité
10 <sup>0</sup>	1,57×10 <sup>9</sup>	3	0	100
10 <sup>-1</sup>	1,57×10 <sup>8</sup>	1	2	33,3
10 <sup>-2</sup>	1,57×10 <sup>7</sup>	0	3	0
10 <sup>-3</sup>	1,57×10 <sup>6</sup>	0	3	0
10 <sup>-4</sup>	1,57×10 <sup>5</sup>	0	3	0

La figure 5 montre la DL<sub>50</sub> de la souche VH1D.

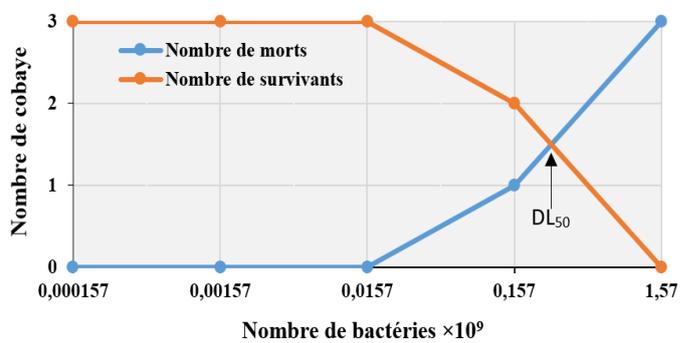


Figure 5: Courbes représentatives du nombre de cobayes morts et survivants par VH1D

La DL<sub>100</sub> de la souche VH1D est:

Selon la méthode de Reed et Muench, la DL<sub>50</sub> est calculée comme suit:

$$\log DL_{50}VH1D = \log 1,57 \times 10^8 + ((0,5-0,33))/((1-0,33)) \log 10;$$

$$DL_{50}VH1D = 2,75 \times 10^8, \text{ donc } DL_{100}VH1D = 27,5 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

La technique de Boyd donne la valeur de la DL<sub>50</sub>VH1D suivante:

$$Y = 66,7 X - 512,7; DL_{50}VH1D = 2,74 \times 10^8 \text{ UFC/ml, donc } DL_{100}VH1D = 27,4 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

**La souche VH2**

Le tableau 8 représente le nombre de cobaye mort et survivant après l'injection par voie intra péritonéale de 1 ml de chaque dilution en cascade de la souche VH2 cultivée à 37°C pendant 20 h dans un milieu liquide de tryptose; le titre de la culture est de 4×10<sup>9</sup> UFC/ml.

Tableau 8: Nombre de cobaye mort et survivant en fonction du titre de VH2

Dilution	Titre UFC/ml	Nombre de morts	Nombre de survivants	Taux de mortalité
10 <sup>0</sup>	4×10 <sup>9</sup>	3	0	100
10 <sup>-1</sup>	4×10 <sup>8</sup>	2	1	66,7
10 <sup>-2</sup>	4×10 <sup>7</sup>	0	3	0
10 <sup>-3</sup>	4×10 <sup>6</sup>	0	3	0
10 <sup>-4</sup>	4×10 <sup>5</sup>	0	3	0

La figure 6 suivante représente graphiquement le nombre de cobayes morts et survivants en fonction du nombre d'E. coli VH2 administré.

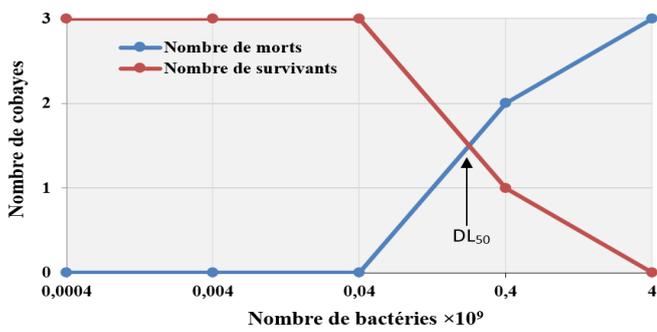


Figure 6: Courbes représentatives du nombre de cobayes morts et survivants provoqués par VH2

Avec la méthode de Reed et Muench, la DLM de la souche VH2 est calculée comme suit:

$$\log DL_{50}VH2 = \log 4 \times 10^7 + ((0,5-0)/(0,66-0)) \log 10;$$

$$DL_{50} VH2 = 2,24 \times 10^8 \text{ UFC/ml, donc } DL_{100}VH2 = 22,4 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

Avec la méthode de Boyd, la DLM de VH2 est:

$$Y=66,7A-506,6; DL_{50}VH2=2,23 \times 10^8 \text{ UFC/ml,}$$

$$\text{donc } DL_{100}VH2=22,3 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

**La souche A1**

Une culture de 20 h à 37°C de la souche A1 dans un milieu tryptose liquide donne  $1,64 \times 10^9$  UFC/ml. Après la dilution en cascade de la souche A1 et l'inoculation par voie intra péritonéale sur le cobaye, le nombre de cobayes morts et survivants est représenté dans le tableau 9.

**Tableau 9: Totaux cumulatifs de cobayes morts et survivants par A1**

Dilution	Nombre de bactéries dans 1 ml	Nombre de morts	Nombre de survivants	Taux de mortalité
10 <sup>0</sup>	1,64×10 <sup>9</sup>	3	0	100
10 <sup>-1</sup>	1,64×10 <sup>8</sup>	3	0	100
10 <sup>-2</sup>	1,64×10 <sup>7</sup>	2	1	66,7
10 <sup>-3</sup>	1,64×10 <sup>6</sup>	0	3	0
10 <sup>-4</sup>	1,64×10 <sup>5</sup>	0	3	0

Le nombre de cobayes morts et survivants dans le tableau 9 sont représentés par les courbes de la figure 7.

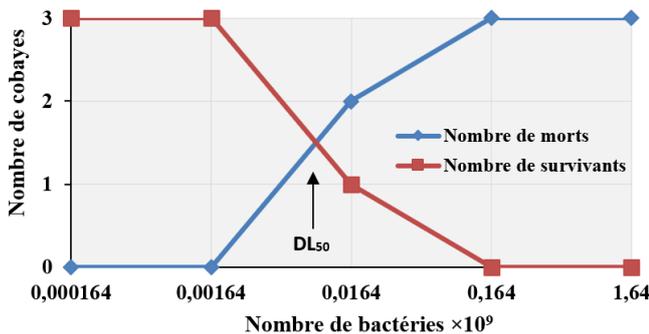


Figure 7: Courbes de détermination de la DL50 de A1

La DL<sub>50</sub> obtenue par la méthode de Reed et Muench:

$$\log DL_{50}A1 = \log 1,64 \times 10^6 + ((0,5-0)/(0,67-0)) \log 10;$$

$$DL_{50}A1 = 0,91 \times 10^7 \text{ UFC /ml, donc } DL_{100}A1 = 0,91 \times 10^8 \text{ UFC /ml}$$

Selon la méthode de Boyd est donnée par une droite à régression linéaire dont l'équation est:

$$YA1 = 33,3XA1 - 173,6; DL_{50}A1 = 0,51 \times 10^7 \text{ UFC /ml,}$$

$$\text{donc } DL_{100}A1 = 0,51 \times 10^7 \text{ UFC /ml}$$

**La souche A2**

Après la culture de 20 h de A2, le titre dans le tube est de  $1,09 \times 10^9$  UFC/ml. Après la dilution en cascade et l'injection de 1 ml de chaque dilution par voie intra péritonéale dans le cobaye, le nombre de bactéries après chaque dilution et le nombre de cobayes morts et vivants sont représentés dans le tableau 10 et figure 8.

**Tableau 10: Nombre de cobayes morts et survivants par A2**

Dilution	Nombre de bactéries dans 1ml	Nombre de morts	Nombre de survivants	Taux de mortalité
10 <sup>0</sup>	1,09×10 <sup>9</sup>	3	0	100
10 <sup>-1</sup>	1,09×10 <sup>8</sup>	2	1	66,7
10 <sup>-2</sup>	1,09×10 <sup>7</sup>	1	2	33,3
10 <sup>-3</sup>	1,09×10 <sup>6</sup>	0	3	0
10 <sup>-4</sup>	1,09×10 <sup>5</sup>	0	3	0

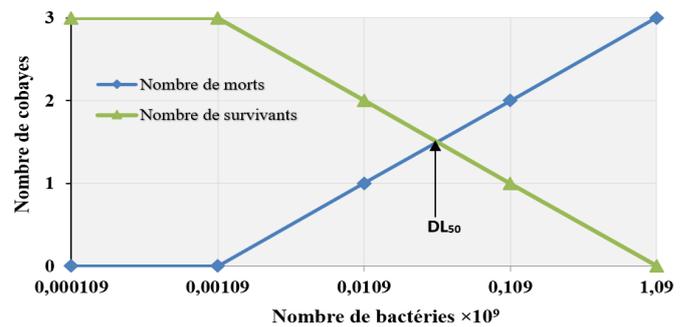


Figure 8: Courbes de détermination de la DL50 de A2

La DL<sub>50</sub>A2 obtenue par la méthode de Reed et Muench est:

$$\log DL_{50}A2 = \log 1,09 \times 10^7 + ((0,5-0,33)/(0,67-0,33)) \times \log 10;$$

$$DL_{50}A2 = 3,45 \times 10^7 \text{ UFC/ml, donc } DL_{100}A2 = 3,45 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

Selon la méthode de Boyd, la DL<sub>50</sub>A2 est donnée par une droite à régression linéaire dont l'équation est:

$$YA2 = 33,3 XA2 - 201,3; DL_{50}A2 = 3,44 \times 10^7 \text{ /ml, donc}$$

$$DL_{100}A2 = 3,44 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

**Optimisation du temps d'incubation de A1 et de A2**

L'ensemencement du même nombre de bactéries des souches A1 et A2 (100 bactéries environ) dans les mêmes conditions donne le résultat résumé dans le tableau 11.

**Tableau 11: Résultats du titrage de A1 et de A2 en fonction du temps d'incubation**

Durée d'incubation à 37°C	19 h	20 h	21 h	22 h	23 h
Titre (UFC/ml) A <sub>1</sub>	0,84×10 <sup>9</sup>	1,44×10 <sup>9</sup>	0,72×10 <sup>9</sup>	0,37×10 <sup>9</sup>	0,3×10 <sup>9</sup>
Titre (UFC/ml) A <sub>2</sub>	0,41×10 <sup>9</sup>	1,19×10 <sup>9</sup>	0,85×10 <sup>9</sup>	0,56×10 <sup>9</sup>	0,3×10 <sup>9</sup>

Le tableau 11 donne la courbe de croissance de A1 et de A2 représentée par la figure 9.

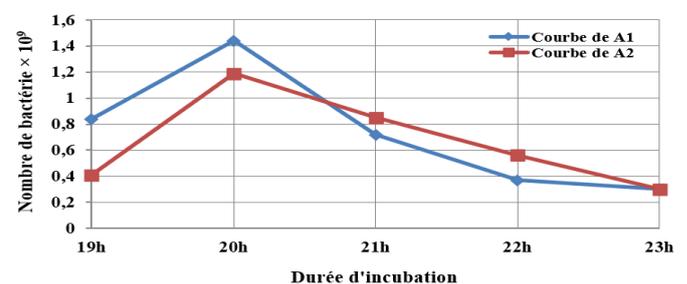


Figure 9: Courbes de croissance des E. coli A1 et A2

### Épreuve virulente sur les cobayes vaccinés

Après 15 jours de la vaccination des 21 cobayes (primo vaccination et dose de rappel), les 21 cobayes vaccinés sont mis à l'épreuve et le nombre de cobayes morts et survivants est donné par le tableau 12.

### DISCUSSION

La récolte des souches a été réalisée dans différents endroits afin d'obtenir différente zone climatique de la croissance bactérienne. L'annotation de chaque prélèvement est l'initiation du nom de lieu de récolte (F: Fandriana, V et VH: Vohidiala; et A: Antananarivo). V est l'initiation du lieu de première récolte (Vohidiala) et pour différencier les souches de la 2<sup>ème</sup> récolte du même endroit, l'annotation de la souche est additionnée de H d'où VH. VH1D est une souche obtenue de la 2<sup>ème</sup> récolte mais elle décolore le milieu gélose rouge de Mac Conkey. Parmi les 27 types de bactéries trouvés dans les 16 prélèvements, seules 8 types de souches (F1, V1, V5, VH1, VH1D, VH2, A1, A2) sont Gram négatifs dont 7 sont des coliformes (ayant les caractéristiques d'*E. coli*). Vu qu'*Escherichia coli* est une bactérie Gram négatif en forme de bâtonnet mobile (Mueller et Tainter, 2023), toutes formes ne vérifiant pas ces trois conditions (forme bâtonnet, mobile et Gram négatif) ne feront pas l'objet pour la suite des études.

Après des séries d'isolement et l'identification des souches, 7 types de souches sont inoculées par voie intra péritonéale de cobaye. La voie intrapéritonéale est choisie pour l'injection de ces souches parce que *E. coli* fait partie de la flore intestinale et est responsable de maladies intestinales et aussi extra-intestinales (Mueller et Tainter, 2023). Le taux de prévalence des *E. coli* dans les diarrhées de veau en 2022 est de 65,6% (Akre et al., 2022).

A une quantité de  $10^8$  à  $10^9$ , la plupart des souches sont pathogènes, seule la souche VH1 ne provoque pas la mort des cobayes testés. Certaines bactéries sont des commensaux inoffensifs (Lorenz et al., 2020). La quantité  $1,21 \times 10^8$  UFC/ml, la souche VH1 n'est pas pathogène pour le cobaye adulte. Par contre, l'injection des autres souches (F1, V1, V5, VH1D, VH2, A1 et A2) par voie intrapéritonéale à partir de  $1,675 \times 10^8$  UFC/ml provoque la mort de cobaye dans 24 h. Ces souches sont pathogènes pour le cobaye adulte. Elles sont utilisées pour l'étude de l'activité de vaccin contre la colibacillose produit par l'IMVAVET vis-à-vis des *E. coli* circulantes.

C'est la dose minimale létale 100% qui doit être injectée pour le test de l'activité du vaccin afin d'éviter que la dose au-delà de cette dose soit trop forte et tue tous les animaux du test même s'ils possèdent des anticorps suffisants pour se protéger.

La détermination de la  $DL_{50}$  est confirmée par trois méthodes. La méthode de Reed et Muench et la méthode de Boyd permettent d'obtenir une valeur plus précise et les valeurs sont à peu près les mêmes. La méthode graphique est un intervalle de valeur permettant de situer la valeur de la  $DL_{50}$ . La méthode graphique justifie les valeurs obtenues lors des méthodes de Reed et Muench et de Boyd. Les cobayes utilisés dans les tests sont vaccinés deux fois: une primo vaccination et un rappel. Comme la protection des vaccins décroît avec le temps (Manus, 2022), la dose vaccinale de rappel est nécessaire pour la booster. Après 15 jours de l'injection de la dose de rappel, le taux de protection animale est estimé atteindre un pic (Rey, 2021). L'épreuve virulente est réalisée en ce moment.

L'étude a montré que les souches F1, V1, V5, VH1D et VH2, à une  $DL_{100}$  comprise entre  $0,093 \times 10^8$  et  $27,4 \times 10^8$  UFC/ml ne présente aucune mortalité pour les cobayes adultes vaccinés, lors de l'injection par voie intra péritonéale. Les cobayes sont immunisés contre ces souches. Ces souches présentent le même antigène que celles introduites dans le vaccin anti colibacillose.

Par contre, les deux souches A1 et A2 sont pathogènes pour les cobayes vaccinés. Elles ont les mêmes caractères physiques et biochimiques avec une différente vitesse d'accroissement dans le même milieu de culture et les mêmes conditions d'ensemencement. La courbe de croissance d'*E. coli* présente une phase de latence, une phase de croissance rapide, une phase stationnaire et une phase de déclin (Joffré et al., 2022). Avec le même nombre de bactéries ensemencées, la souche A1 se multiplie plus vite que la souche A2. Les deux souches diffèrent aussi sur leur pathogénicité. Les  $DL_{100}$  de A1 sur les cobayes qui sont de  $0,91 \times 10^8$  UFC/ml et  $0,51 \times 10^7$  UFC/ml sont plus petites que celles de A2 qui sont de  $3,45 \times 10^8$  UFC/ml et  $3,44 \times 10^7$  UFC/ml. La souche A1 est plus virulente par rapport à la souche A2 car elle possède un petit nombre de bactéries pour tuer 100% des individus testés.

Le vaccin utilisé ne protège pas les cobayes contre les souches circulantes d'*E. coli* A1 et A2. Les cobayes vaccinés testés sont tous morts après 24 h dans l'épreuve après l'injection des doses minimales létales d'*E. coli* A1 et de A2. Les antigènes contenus dans le vaccin anti-colibacillose ne sont pas les mêmes que ceux des deux types d'*E. coli* A1 et A2. Ces deux souches circulantes méritent d'être étudiées plus profondément et leur antigène vaut la peine d'être introduit dans la composition du vaccin contre la colibacillose.

**Tableau 12: Résultats du test d'épreuve de A1 et A2 sur les cobayes vaccinés**

Souche	Témoins	Vaccinés	Nombre de cobayes morts		Nombre de cobayes survivants	Pourcentage de protection
			Témoins	Vaccinés		
F <sub>1</sub>	2	3	2	0	3	100
V <sub>1</sub>	2	3	2	0	3	100
V5	2	3	2	0	3	100
VH <sub>1D</sub>	2	3	2	0	3	100
VH <sub>2</sub>	2	3	2	0	3	100
A <sub>1</sub>	2	3	2	3	0	0
A <sub>2</sub>	2	3	2	3	0	0

## CONCLUSION

Dans cette étude, seules les souches pathogènes sont utilisées pour le test de l'activité du vaccin, parce que ce sont les souches pathogènes qui doivent être écartées de l'élevage pour la bonne santé des bétails. Par la diversité de groupes d'*E. coli*, le vaccin produit pour la protection contre la colibacillose n'immunise pas les cobayes contre tous les différents types. Plusieurs souches virulentes n'affectent pas les cobayes vaccinés car ils sont immunisés, par contre d'autres souches restent une menace pour les animaux vaccinés et l'élevage de Madagascar.

Les tests d'une trentaine d'*E. coli* ne permettent pas totalement l'évaluation du vaccin contre la colibacillose produit par l'IMVAVET, elle permet d'apporter des connaissances scientifiques et d'initier d'autres recherches pour améliorer le vaccin existant. D'autres travaux méritent d'être continués afin de pouvoir prévenir les maladies provoquées par tout type d'*E. coli* pathogène ralentissant le développement de l'élevage à Madagascar.

## RÉFÉRENCES

- Adingra A.A., Kouadio A.N., Kouassi A.M. (2011). *Fiches Techniques et Documents de Vulgarisation: 22-27*. aquadocs.org/
- Akre D.S.T., Okou O.C., Koffi A.E., Ebe K.B., Ackah J.A.A. B. (2022). Prévalence et phénotypes de résistances aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* responsables des diarrhées de veaux à Daloa, Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 16: 2685-2698.
- Boyd E.M., Abel M. (1966). The acute toxicity of barium sulfate administered intragastrically. *Canadian Medical Association Journal*, 94: 849.
- Clave D. (2013). Fiche technique bactériologie. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique, 3p. iques: i
- Decousser J.W., Bertrand S.R., Pozzetto B. (2023). Les prélèvements de surface pour la recherche ciblée de micro-organismes spécifiques: intérêts et limites. *Hygiènes*, XXXI: 53-59.
- Diassana A. (2018). Identification des souches d'*Escherichia coli* dans les selles en rapport avec la malnutrition à Diaro. Thèse de doctorat, Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako, Mali. 58 p.
- Fairbrother J.M., Nadeau E. (2006). *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev. Sci. Tech.*, 25: 555-569.
- Ginglen J.G., Doyle M.Q. (2024). Immunization. Publishing LLC.
- Https 1. Procédure hygiène et sécurité. <http://azaymycobacteries.free.fr/GBEA/PRHS001.pdf>
- Https 2. [https://www.diplomatie.gouv.fr/IMG/jpg/madagascar-2\\_cle02b79d.jpg](https://www.diplomatie.gouv.fr/IMG/jpg/madagascar-2_cle02b79d.jpg)
- Joffré E., Xiao X., Correia M.S., Nookaew I., Sasse S., Globisch D., Sjöling Å. (2022). Analysis of growth phases of enterotoxigenic *Escherichia coli* reveals a distinct transition phase before entry into early stationary phase with shifts in tryptophan, fucose, and putrescine metabolism and degradation of neurotransmitter precursors. *Microbiology Spectrum*, 10: e01755-21.
- Lorenz B., Ali N., Bocklitz T., Rösch P., Popp J. (2020). Discrimination between pathogenic and non-pathogenic *E. coli* strains by means of Raman microspectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412: 8241-8247.
- Manus J.M. (2022). Brève: Pourquoi un second rappel ? *Revue Francophone des Laboratoires*, 543: 11.
- Maris S. (2016). Caractérisation de souches d'*Escherichia coli* pathogènes urinaires provenant de Guadalupe: portrait de la diversité des facteurs de virulence présents. Mémoire présentée pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (MSc) en Microbiologie Appliquée Université du Québec: 99 p.

- Mueller M., Tainter C.R. (2023). Infection à *Escherichia coli*. Stat Pearls Publishing.
- Neogene (2020). Tryptose Broth (NCM0087), Technical Specification Sheet. Neogene Culture Media. 2p.
- OMS (2008). Les diarrhées à *Escherichia coli*. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 58: 831-847.
- Reed L., Muench H.A. (1938). Simple method of fifty percent points. *Am. J. Hyg.*, 27: 293.
- Rey M. (2021). Vaccinations. Dans: Immunologie de la vaccination: Immunogénicité des vaccins. Ministère de la Santé et des Services sociaux, Québec.
- Saganuwan A.S. (2011). A modified arithmetical method of Reed and Muench for determination of a relatively ideal median lethal dose (LD 50). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 5: 1543-1546.