

Etude physico-chimique et biologique d'un substrat de lyophilisation pour le virus peste équine (*)

par

C. STELLMANN, S. GHAZARIAN, E. LEFTHERIOTIS,
M. KOROURIAN et H. GILBERT

La lyophilisation des suspensions virales est une des techniques qui s'est révélée être la solution de choix au problème de la conservation des souches virales et de certains virus-vaccins [9] [10] [12]. En effet, les suspensions lyophilisées possèdent une remarquable stabilité thermodynamique, mais le choix du substrat de lyophilisation pour un virus donné est fondamental pour obtenir un rendement optimum car, selon les virus, ces substrats sont différents et de nombreuses formules ont été proposées [10].

Pour le virus peste équine, une étude précise [6] a mis en évidence la supériorité d'un substrat parfaitement défini, dénommé «Lactose - Peptone - tris»; ce substrat est étudié, dans notre travail, du point de vue physico-chimique d'une part, pour préciser les paramètres de lyophilisation, et du point de vue biologique d'autre part, pour estimer la stabilité thermodynamique du virus et l'action de la concentration saline sur cette stabilité.

1. — MATERIEL ET METHODES

1. Virus

Le virus peste équine de type 9, souche S2/souris, est cultivé sur cellules MS et nous utilisons le virus ayant subi au moins 6 passages sur cellules MS; le milieu de production du virus est le milieu Earle contenant 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine, 0,005 p. 100 d'extrait de levure et 1 p. 100 de sérum de veau.

2. Titrage du virus

Le virus dilué en milieu ELY (Earle - hydrolysate de lactalbumine - extrait de le-

(*) Avec la collaboration technique de MM. L. CHRETIEN, A. FROSSARD, A. EICHENLAUB et J. ROUX.

(**) Revue Méd. vét., 1969, 120, 12, 1053.

vure) est titré sur des tubes (*) de cellules MS. L'intervalle logarithmique de dilution est 0,6. 4 dilutions virales sont inoculées à raison de 5 tubes par dilution, chaque tube recevant 1 ml de dilution virale; ces tubes sont ensuite placés à 37° C durant 6 jours sur roller-tube.

La lecture microscopique finale du titrage s'effectue au 6^e jour et le titre est exprimé en DECP 50/ml, calculé selon la méthode de Kärber.

3. Substrat de lyophilisation, dénommé LPT

Ce substrat est préparé comme suit:

Solution A

Lactose	200 g
Peptone	40 g
Pénicilline G	400 000 U
Dihydrostreptomycine	400 000 γ
Eau déminéralisée QSP	1 000 ml

Solution B

Tris(**) (0,2 M = 24,2 g/litre)	250 ml
H-Cl (0,2 M = 7,3 g/litre)	207 ml
Eau déminéralisée QSP	1 000 ml

Nous ajoutons éventuellement du rouge de phénol à la concentration finale de 20 mg/litre, car ce colorant est un test coloré de contrôle du vide des ampoules scellées [4].

Les solutions A et B sont mélangées, puis filtrées sur membrane Millipore 0.22 μ . Le pH doit être compris entre 7,4 et 7,6; il est ajusté éventuellement avant filtration.

Le rapport des volumes, entre le substrat LPT et la suspension virale plus ou moins diluée, est 1/1 pour obtenir une concentration finale de 5 p. 100 en lactose et 1 p. 100 en peptone; pour préparer les concentrations salines variables, la suspension virulente est plus ou moins diluée à l'aide de milieu ELY ou d'eau déminéralisée.

Des exemples de préparation sont transcrits dans le tableau n° 1.

Substrat de lyophilisation LPT	Milieu ELY	Eau déminéralisée	Suspension virale en ELY	Volume total	p. 100 en eau déminéralisée(***)
100	90		10	200	0
100	60	30	10	200	15
100	30	60	10	200	30
100		90	10	200	45

TABLEAU No 1. — Préparation de suspensions virales de concentrations salines variables.

(*) Tubes 16/160.

(**) TRIS: (hydroxyméthyl) amino méthane (FLUCKA).

(***) Par rapport au volume total.

4. Mesure de l'abaissement du point de cryoscopie

Les contrôles de cryoscopie sont effectués sur des échantillons de 20 à 30 ml par la mesure de l'abaissement du point de congélation (Δt) des solutions, à l'aide d'un thermomètre Beckman au 1/100° C et d'un mélange cryogénique (éthanol + neige carbonique ou chlorure de Na + glace).

5. Mesure du point d'eutéxie

Les mesures du point d'eutéxie sont effectuées à l'aide des sondes de résistivité du lyophilisateur (USIFROID SMJ) à la décongélation des solutions.

6. Mesure de l'humidité résiduelle (*)

Après lyophilisation, nous dosons le pourcentage d'humidité résiduelle (HR) selon la technique de K. FISHER [10] sur 5 échantillons de la même série de lyophilisation.

7. Lyophilisation

Les suspensions virales sont lyophilisées, soit en flacons (**) dans l'appareil USIFROID SMJ, soit en ampoules (***) dans l'appareil EDWARDS (****).

Les congélations primaires sont rapides et effectuées aux environs de -40° C. Les températures de lyophilisation sont inférieures de 7 à 10° C à la température d'eutéxie des solutions.

Les durées de lyophilisation sont calculées en fonction des graphiques de lyophilisation (24 à 40 heures).

Après la lyophilisation, les flacons ou les ampoules sont fermés sous vide.

II. — RESULTATS

A) ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE

1. — Corrélation entre t , le point d'eutéxie (P E) et le pourcentage en eau déminéralisée (E D) du mélange.

Le tableau no 2 contient les valeurs de Δt , P E et E D expérimentales.

Nous posons :

$x = \Delta t$ valeur absolue du point de cryoscopie en °C,

$y = P E$ valeur absolue du point d'eutéxie en °C,

(*) Les auteurs remercient vivement Mlle M. T. FAYET pour la réalisation de ces mesures.

(**) Flacon type pénicilline 5/8 ou 10/12 contenant 2 ml de liquide. type pénicilline 20/24 contenant 5 ml de liquide congélation verticale.

(***) Ampoule de 5 ml contenant 2 ml de liquide, congélation oblique.

(****) 2 types - centrifugeuse Freeze Dryer - modèle 30 PI/570. centrifugeuse Freeze Dryer - modèle 30 P/422.

$z = E D$ par rapport à la formule du mélange du tableau no 1.
 Les corrélations suivantes ont été calculées:

- entre Δt et P E

$$x = [0,0967 + 0,02275 y] \pm 0,065 \quad r = 0,868 \quad N = 17$$

entre Δt et E D

$$x = [0,679 - 0,436 z] \pm 0,023 \quad r = 0,987 \quad N = 17$$

entre P E et E D

$$v = [24,884 - 14,454 z] \pm 2,58 \quad r = 0,86 \quad N = 17$$

Toutes ces corrélations sont hautement significatives et nous remarquons que la corrélation entre Δt et E D vérifie la loi de RAOULT (graphiques no 1, 2 et 3).

Les équations précédentes permettent de prévoir les valeurs de P E en fonction, soit de Δt soit de E D; d'autre part, nous avons observé que, lorsque la concentration saline augmente, la température de lyophilisation diminue et la durée de lyophilisation augmente.

2. — Corrélation entre Δt et l'humidité résiduelle (H R).

Les pourcentages d'humidité résiduelle obtenus lors de divers essais sont transcrits dans le tableau no 2.

Les mesures de H R sont connues à $\pm 0,3$ (*)

p. 100 d'eau du mélange	Δt — °C		Point de décongélation en — °C (Eutéxie)		Température de lyophilisation en — °C	Humidité résiduelle en p. 100				
0	0,66 0,67 0,68 0,68 0,69 0,69	0,679 (**)	25 24 25 24 25 25	24,9 (***)	32	2,6(****)	3	3,4	2,6	2,9
12,5	0,62 0,63 0,63	0,625	23 22 26	23,0	32	3,7	3,3	2,4	3,7	
22,5	0,57 0,57 0,57	0,581	21 22 20	21,6	32	3,4	3,4	2,8	2,7	
25	0,58 0,59 0,59	0,57	22 20 24	21,1	28	2,5	3,3	3,2	2,8	
45	0,47 0,49	0,483	19 17	18,4	28	2,4	2,8	2,3	2,8	

TABLEAU N° 2. — Résultats expérimentaux de mesures sur différents mélanges-substrats.

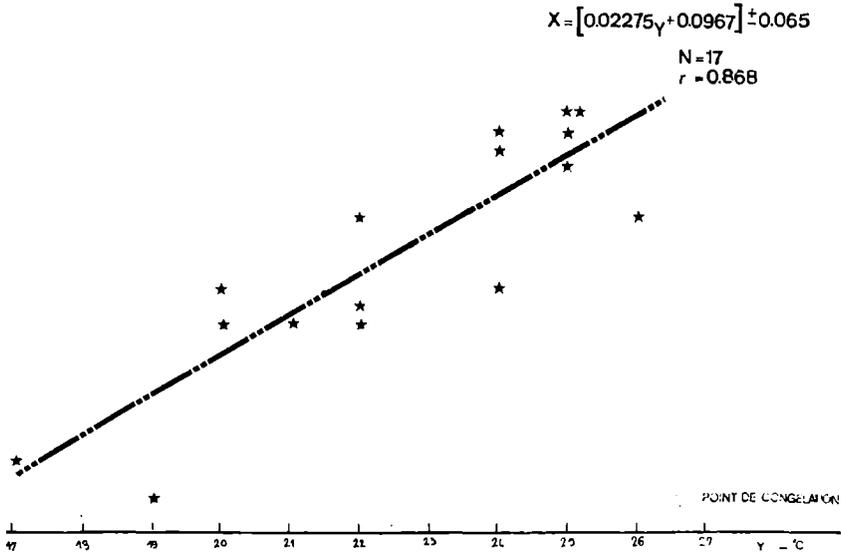
(*) Probabilité 0,95.

(**) Δt théorique d'après l'équation de corrélation calculée.

(***) Point de décongélation Théorique d'après l'équation de corrélation calculée.

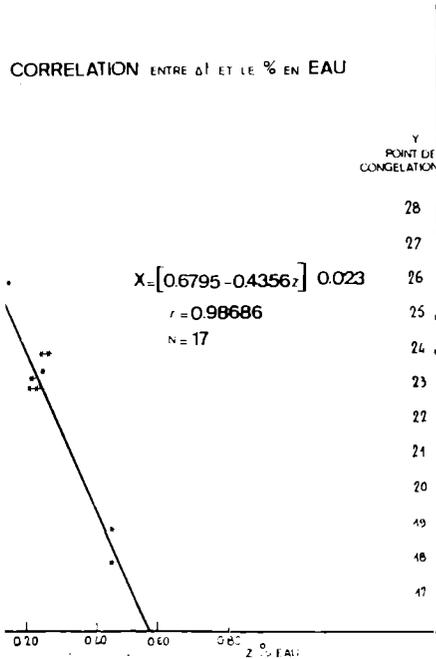
(****) Moyenne de 5 échantillons du même lot de lyophilisation.

CORRELATION ENTRE ΔT ET POINT DE CONGELATION



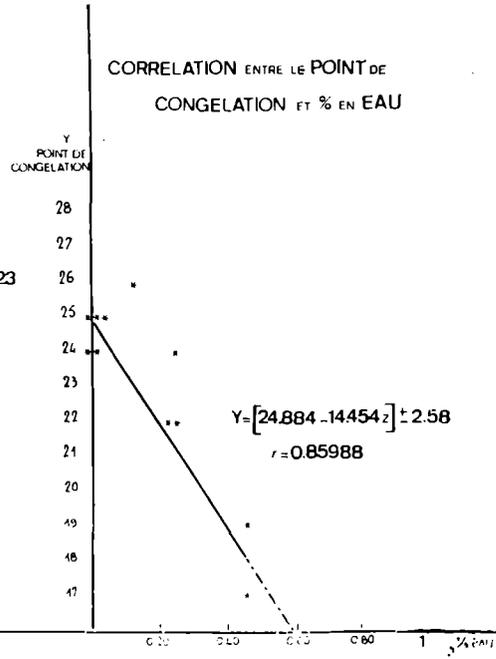
GRAPHIQUE n° 1.

CORRELATION ENTRE ΔT ET LE % EN EAU



GRAPHIQUE n° 2.

CORRELATION ENTRE LE POINT DE
CONGELATION ET % EN EAU



GRAPHIQUE n° 3.

L'analyse de ces résultats met en évidence une corrélation entre Δt et H R.

$$\text{H R (en \%)} = [1,296 + 2,895 \Delta t] \pm 0,75 (*) \quad r = 0,47 \quad N = 20$$

Cette corrélation significative entre 0,05 et 0,02 permet de lier le Δt de la suspension à lyophiliser à une H R, lorsque les paramètres de lyophilisation sont constants pour un Δt donné.

3. — Conclusion de l'étude physico-chimique.

La connaissance des diverses relations numériques permet, en fonction d'un seul paramètre choisi, de prévoir les autres paramètres de la lyophilisation.

B) ETUDE BIOLOGIQUE

1. — Perte de titre infectieux lors de la lyophilisation ou rendement de lyophilisation.

Nous appelons «rendement de lyophilisation», la perte de titre infectieux durant la lyophilisation, exprimée en log.

Le tableau no 3 contient les rendements de lyophilisation de divers essais en fonction du Δt cryoscopique.

Δt (**) — °C	Perte (***) du titre infectieux en log 10		Analyse
0,23	0,70		$y = [1,258 - 1,740 \Delta t] \pm 0,41^{(*)}$ $r = 0,74$ $N = 11$ Significatif entre 0,02 et 0,01
0,27	1,1	0,95	
0,31	0,70	0,45	
0,42	0,30	0,65	
0,47	0,47		
0,57	0 — 0,50 — 0,35		

TABLEAU N° 3. — Rendement de lyophilisation.

L'analyse de ces résultats permet de tirer une corrélation de la forme:

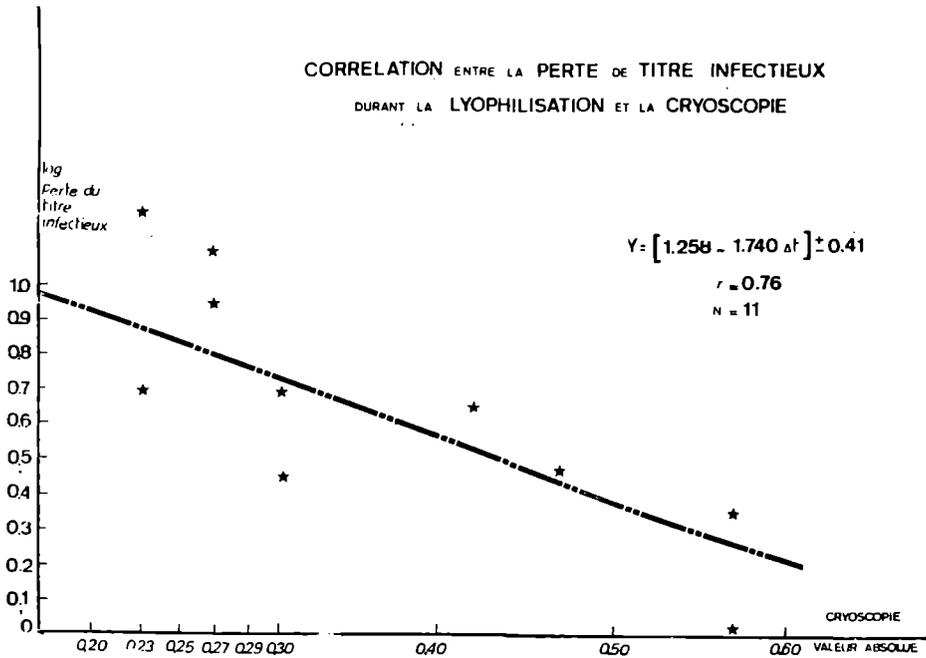
$$\log (\text{perte de titre}) = [1,258 - 1,74 \Delta t] \pm 0,41 \quad r = 0,74 \quad N = 11$$

Cette corrélation, significative entre 0,02 et 0,01, met en évidence que la perte du titre infectieux à la lyophilisation est inversement proportionnelle à la concentration saline. La mesure de Δt cryoscopique permet donc de prévoir la perte du titre infectieux lors de la lyophilisation, avec les limites théoriques de cette perte (graphique no 4), en opérant avec les paramètres de lyophilisation propres à chaque Δt .

(*) Probabilité 0,95.

(**) Abaissement cryoscopique.

(***) Différence du titre infectieux avant et après lyophilisation.



GRAPHIQUE n° 4.

2. — Décroissance du titre infectieux du virus lyophilisé en fonction de la température de conservation et du Δt cryoscopique.

a) Analyse globale des résultats

Trois suspensions virulentes sont préparées avec le substrat LPT dont les concentrations salines seules varient; les 3 suspensions virulentes sont réparties en ampoules, puis lyophilisées et scellées sous vide. Après la lyophilisation les ampoules sont divisées en 4 lots qui sont respectivement conservés à -25 , $+4$, $+25$ et $+37^{\circ}\text{C}$. Ces virus sont titrés après des durées de conservation croissantes.

L'analyse de variance des résultats de ces titrages contenus dans le tableau no 4 met en évidence la significativité des facteurs et de leurs interactions (tableau no 5).

Nous en tirons les conclusions suivantes:

- les variations du titre dans le temps sont fonction de la température de conservation et du Δt cryoscopique; il faut donc considérer chaque lot et chaque température séparément.

Température de conservation	Abaissement cryoscopique Δt	Durée de conservation en jours							
		0	8	23	35	84	125	155	210
- 25 ° C	- 0,23 ° C	3,7*	3,5	3,8	3,5	4,1	4,1	4,1	4,55
	- 0,47 ° C	3,95	4,05	4,05	4,05	3,9	4,4	4,3	4,7
	- 0,57 ° C	4,05	4,5	4,3	3,55	4,3	4,7	4,8	5,15
+ 4 ° C	- 0,23 ° C	3,7	3,55	3,55	4,3	3,9	4,2	4,3	4,25
	- 0,47 ° C	3,95	3,55	3,8	4,05	4,3	4,5	4,2	4,55
	- 0,57 ° C	4,05	4,55	4,3	4,3	4,7	4,6	5,2	4,7
+ 25 ° C	- 0,23 ° C	3,7	3,55	4,05	4,05	3,3	3,6	3,9	3,7
	- 0,47 ° C	3,95	4,3	3,5	4,3	3,9	3,7	3,6	—
	- 0,57 ° C	4,05	4,05	4,0	3,8	4,1	2,8	3,3	3,4
+ 37 ° C	- 0,23 ° C	3,7	3,8	3,0	4,05	3,5	3,2	3,1	3,0
	- 0,47 ° C	3,95	4,05	3	4,30	3,3	2,8	2,65	2,4
	- 0,57 ° C	4,05	4,05	3,3	3	2,5	2	—	—

TABLEAU N° 4. — Cinétique des titres infectieux du virus peste équine, après lyophilisation en fonction de l'abaissement cryoscopique et de la température de conservation.

Source de variation	Degré de liberté	Variance	Test de significativité F	Significativité
<i>Effet principal</i>				
Jours = J	6	0,18209	$F \frac{6}{33} = 3,028$	entre 0,05 et 0,01
Température = T	3	4,70165	$F \frac{3}{33} = 78,20$	< 0,01
Cryoscopie = C	2	0,36066	$F \frac{2}{33} = 5,999$	< 0,01
<i>Interaction de 1^{er} ordre</i>				
JT	18	0,44534	$F \frac{18}{33} = 7,40$	< 0,01
JC	12	0,25764	$F \frac{12}{33} = 4,28$	< 0,01
TC	6	0,35816	$F \frac{6}{33} = 5,95$	< 0,01
Résiduelle JTC	33	0,0612	Ecart-type s = 0,24	

TABLEAU N° 5. — Analyse de variance du tableau n° 4.

(*) Titre infectieux en \log_{10} DECP 50/ml titré sur cellules MS.

- la température de conservation et le Δt interagissent entre eux.
- l'erreur sur un titrage est $\pm 0,48$ (probabilité 0,95).

b) *Relation entre les titres infectieux en fonction de la température de conservation, du temps et de Δt .*

Nous définissons «p» la pente de décroissance comme étant la perte de titre par unité de temps (jour).

Pour chaque lot de lyophilisation et chaque température, nous calculons la droite de régression liant le titre du virus et la durée de conservation; nous assimilons dans ce cas la décroissance du titre à une équation linéaire car nous n'avons aucun moyen de démontrer la non-linéarité d'une telle relation. Nous obtenons ainsi 12 régressions (tableau no 6), certaines sont significatives, c'est-à-dire que la pente «p» est significativement différente de 0.

Cryoscopie Δt	Température T	px 1000	Equation de décroissance	Significativité de la perte
- 0,23 ° C	- 25 ° C	+ 4,4	y = 4,4x + 3,53	inférieure à 0,01 (*)
	+ 4 ° C	+ 3,13	y = 3,13x + 3,72	entre 0,05 et 0,10 (**)
	+ 25 ° C	- 0,7	y = - 0,7x + 3,80	supérieure à 0,10
	+ 37 ° C	- 3,19	y = - 3,19x + 3,67	supérieure à 0,10
- 0,47 ° C	- 25 ° C	+ 3,31	y = 3,31x + 3,92	inférieure à 0,01 (*)
	+ 4 ° C	+ 4,09	y = 4,09x + 3,76	inférieure à 0,01 (*)
	+ 25 ° C	- 3,12	y = - 3,12x + 4,11	supérieure à 0,10
	+ 37 ° C	- 7,65	y = - 7,65x + 3,93	entre 0,05 et 0,10 (**)
- 0,57 ° C	- 25 ° C	+ 4,95	y = 4,95x + 4,02	inférieure à 0,05 (*)
	+ 4 ° C	+ 4,34	y = 4,34x + 4,30	entre 0,05 et 0,10 (**)
	+ 25 ° C	- 4,50	y = - 4,50x + 4,05	entre 0,05 et 0,10 (**)
	+ 37 ° C	-15,55	y = -15,55x + 3,83	inférieure à 0,01 (*)

TABLEAU N° 6. — Equation des droites de régression en fonction de la cryoscopie et de la température.

Commentaires sur le tableau no 6

Ces régressions permettent d'estimer le titre théorique de chaque lot de virus à un temps donné.

Les pentes de décroissance à +4 et -25° C sont positives et significatives; ce résultat est surprenant et illogique à première vue, le titre augmentant avec le temps. L'explication d'un tel phénomène serait apportée par la variation de sensibilité des cellules MS au virus en fonction des générations cellulaires; en effet, l'entretien des cellules MS nécessite 2 passages par semaine, chaque passage correspondant à un facteur de multiplication moyen de 4 à 6, soit 2 à 3 générations cellulaires par passage. Notre essai s'étalant sur 210 jours, les cellules MS ont donc subi au moins 50 passages, soit 100 à 150 générations cellulaires; la sensibilité cellulaire au virus augmenterait en fonction du nombre de générations cellulaires; nos résultats expérimentaux sont donc la résultante de la décroissance du titre infectieux du virus due à la conservation et de l'augmentation de la sensibilité cellulaire.

(*) Significative au seuil de 0,05.

(**) Significative au seuil de 0,10.

Pour poursuivre notre analyse et tenir compte de cet épiphénomène, nous retrançons, arbitrairement (*), la valeur 0,005 de toutes les pentes contenues dans le tableau no 6 pour obtenir les valeurs expérimentales corrigées du tableau no 7.

c) Etude de l'équation générale liant la pente de décroissance à la température de conservation et au Δt

Pour préciser l'interaction mise en évidence dans l'analyse de variance des tableaux n° 4 et 5, nous avons calculé les paramètres d'une équation du type tridimensionnel [1] que la loi thermodynamique d'ARRHENIUS [5] [13] permet de prévoir :

$$(I) \log p = (a + b \Delta t) 1/T + (c + d \Delta t)$$

p = pente de décroissance en fonction du temps exprimée en jours,

Δt = valeur absolue du point de cryoscopie en °C,

T = température de conservation exprimée en température absolue.

L'équation (I) est la décomposition de l'équation (II) pour un Δt donné.

$$(II) \log p = A 1/T + B$$

Les valeurs expérimentales corrigées de $\log p$ sont transcrites dans le tableau n° 7.

1° temps de calcul

Pour chaque Δt nous calculons l'équation (II) par une corrélation statistique classique et ces équations expérimentales sont transcrites dans le tableau n° 8.

2° temps de calcul

Nous estimons, ensuite, par corrélation, $A = a + b \Delta t$ et $B = c + d \Delta t$, à l'aide des valeurs expérimentales de A et B calculées précédemment et de la valeur de Δt (tableau n° 8).

Tous les paramètres calculés sont contenus dans le tableau no 9. La formule développée (I) est représentée graphiquement par un éventail de droites convergentes en un point M dont les coordonnées sont estimées dans le tableau no 9 et représentées sur le graphique no 2. Ce modèle mathématique descriptif est très proche des valeurs expérimentales dans les limites de notre essai; une seule valeur sur 12 n'est pas conforme au modèle mathématique théorique (tableau no 7 et graphique no 5).

L'équation numérique développée (III)

$$(III) \log p = -115,45 - 5,819 \Delta t \frac{1}{T} - 1,996 + 19,915 \Delta t$$

(*) Arbitrairement, car nous ignorons la valeur exacte de la variation de sensibilité cellulaire; toutefois, nous estimons que la meilleure conservation du virus serait celle obtenue à -25°C et pour $\Delta t = 0,57$.

Température	- 25 ° C		4 ° C		25 ° C		37 ° C	
Inverse de la température absolue $\frac{1}{T}$	0,0043		0,00361		0,00335		0,00322	
Δt (*) cryoscopique	p (**)	po (**)	p	po	p	po	p	po
0,23	0,0006 - 3,20***	0,00055 - 3,27***	0,00187 - 2,725	0,0022 - 2,65	0,0057 - 2,245	0,0051 - 2,29	0,00819 - 2,085	0,0079 - 2,10
0,47	0,00169 - 2,78	0,0001 - 4	0,00091 - 3,04	0,0013 - 2,89	0,00812 - 2,09	0,0066 - 2,18	0,0126 - 1,90	0,015 - 1,82
0,57	0,00005 - 4,3	0,000035 - 4,45	0,00066 - 3,18	0,00095 - 3,02	0,0095 - 2,02	0,0074 - 2,13	0,02055 - 1,685	0,0185 - 1,72

TABLEAU N° 7.

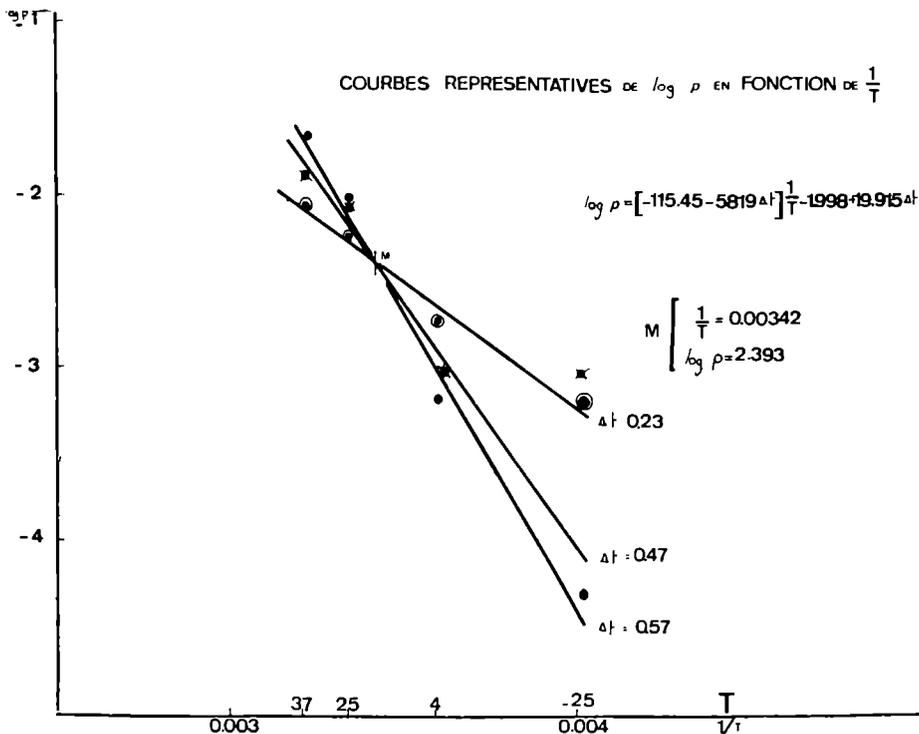
(*) Δt en valeur absolue.

(**) p valeur absolue expérimentale de p (corrigée)

po valeur absolue calculée de p.

(***) Colog p et colog po (p exprimé en perte de titre infectieux par jour).

permet de prévoir, pour un Δt donné, la valeur théorique de l'équation (II), donc d'estimer la valeur de $\log p$ pour une température de conservation donnée, avec ses limites d'erreur à la probabilité 0,95; ces valeurs théoriques pour les valeurs de Δt de notre essai sont transcrites dans le tableau no 7.



GRAPHIQUE n° 5.

Δt cryoscopique	Equation expérimentale	Equation théorique
0,23	$\log p = 2,417 - 1402 \frac{1}{T}$ $s^2y = 0,00298$ $r = 0,994$ $N = 4$	$\log p_0 = 2,582 - 1453 \frac{1}{T}$
0,47	$\log p = 7,924 - 3025 \frac{1}{T}$ $s^2y = 0,01177$ $r = 0,984$ $N = 3$	$\log p_0 = 7,362 - 2850 \frac{1}{T}$
0,57	$\log p = 8,957 - 3308 \frac{1}{T}$ $s^2y = 0,01822$ $r = 0,993$ $N = 4$	$\log p_0 = 9,353 - 3432 \frac{1}{T}$

TABLEAU n° 8. — Relation entre $\log p$ et $\frac{1}{T}$ en fonction du point cryoscopique.

Equation développée :

$$\log p = \left[a + b \Delta t \right] \frac{1}{T} + c + d \Delta t$$

$$\log p = A \frac{1}{T} + B$$

$$B = c + d \Delta t = \left[-1,998 + 19,915 \Delta t \right] \pm 1(*)$$

$$A = a + b \Delta t = \left[-115,45 - 5819 \Delta t \right] \pm 312(*)$$

$$\log p = \left[(-115,45 - 5819 \Delta t) \frac{1}{T} - 1,998 + 19,915 \Delta t \right] \pm 0,19(*)$$

point de convergence M

$$\frac{1}{T} = \frac{d}{b} = 0,00342$$

$$\log p = c - \frac{ad}{b} = -2,393 \pm 0,057 (*)$$

Calcul de $s^2 \log p = \frac{\sum \frac{v}{N}}{l} = 0,00884$ $2s = 0,19$

TABLEAU n° 9. — Paramètres de l'éventail des droites liant
 $\log p$ à $\frac{1}{T}$ en fonction de Δt

(*) Probabilité 0,95.

Conclusions sur l'équation (III)

Le modèle mathématique proposé n'est valable que dans les limites de notre expérimentation; mais il est remarquable que cette équation soit conforme à l'hypothèse émise sur la thermostabilité des produits lyophilisés, à savoir que la stabilité thermique d'un produit lyophilisé est d'autant meilleure que le pourcentage d'humidité relative est faible, ou contenu dans certaines limites: dans l'équation (II), lorsque Δt tends vers 0, la pente de décroissance diminue. Ainsi, dans notre essai, la meilleure stabilité obtenue avec la concentration saline correspondant à un point cryoscopique de $-0,23^\circ \text{C}$.

Précédemment, nous avons montré que le rendement de lyophilisation était inversement proportionnel à Δt : lors de lyophilisation, la perte de titre infectieux est la plus grande avec un $\Delta t = -0,23^\circ \text{C}$. Ces deux constatations montrent qu'un compromis existe

- le rendement de lyophilisation,
- la thermostabilité ultérieure du virus lyophilisé.

Le choix de cette alternative est le fait de l'expérimentateur en fonction des modalités d'emploi du virus lyophilisé; si l'on s'agit de conserver des souches, le rendement de lyophilisation n'est pas primordial, ce qui est essentiel c'est d'obtenir une thermostabilité maximale; par contre, s'il s'agit de produire un virus-vaccin destiné à la pro-

phylaxie, le rendement de lyophilisation est un facteur non négligeable et la limite de validité du produit lyophilisé sera fonction des modalités de son utilisation.

III. — DISCUSSION

1. — Sensibilité cellulaire à l'infection virale

Les pentes positives de décroissance des titres infectieux pour des températures de conservation -25 et $+4^{\circ}$ C soulèvent le problème de la stabilité de la sensibilité des lignées cellulaires à l'infection virale. Certains auteurs ont déjà mis en évidence les variations de sensibilité cellulaire pour des cellules primaires [2]. Ces variations sont délicates à contrôler et, dans le cadre de notre expérimentation, elles sont apparues comme un facteur non négligeable qui interfère avec les paramètres que nous désirions étudier.

2. — Humidité résiduelle

Les variations d'humidité résiduelle de nos essais sont très faibles, mais, malgré tout, ces variations sont liées aux variations de Δt . La nature même de l'humidité résiduelle des produits lyophilisés est loin d'avoir été élucidée et de nombreux commentaires pourraient être faits à son sujet [10].

Les particules virales contiennent des molécules d'eau qui font partie de la structure même du virion: il s'agit là d'une «cellule en miniature». La lyophilisation des virus peut donc aboutir à une perte de l'intégrité structurale et on peut penser qu'un minimum de pourcentage d'humidité résiduelle est nécessaire pour ne pas rompre la structure fonctionnelle des particules virales [10].

3. — Concentration saline et rendement de lyophilisation

La concentration saline est un facteur limitant de la congélation primaire des solutions, précédant la lyophilisation, car des zones d'hyperconcentrations salines sont destructrices de l'intégrité structurale des virus, ce qui est vérifié lors de la congélation du virus peste équine sans précaution particulière [6] [8].

Lorsque la congélation primaire est effectuée à très basse température et rapidement, cet effet destructeur de l'hyposalinité est limité et, dans ce cas, le rendement de lyophilisation est excellent pour certains virus, tel le virus du sarcome de ROUS [10]. Pour le virus peste équine, à la vue de nos essais, une concentration saline élevée joue un rôle protecteur lors de la lyophilisation.

4. — Rôle du lactose et de la peptone dans le substrat de lyophilisation

Le lactose et la peptone ont un triple rôle lors de la lyophilisation:

- un rôle protecteur et régulateur de la cristallisation de l'eau lors de la congélation primaire;
- le lactose est un stabilisateur de l'humidité résiduelle;
- un rôle de support pour obtenir une pastille de lyophilisation compacte [10].

IV. — CONCLUSION

L'étude physico-chimique et biologique d'un substrat de lyophilisation pour le virus peste équine a permis d'estimer certains paramètres de lyophilisation, tels que la température d'eutéxie et le pourcentage d'humidité résiduelle en fonction de la concentration saline.

La perte du titre infectieux lors de la lyophilisation est liée à la concentration saline de la suspension virulente.

La stabilité thermodynamique est étudiée selon un modèle mathématique descriptif tridimensionnel, ce qui permet de prévoir la pente de décroissance du virus lyophilisé à différentes températures de conservation selon la concentration saline initiale du lyophilisat.

A physico-chemical study of a substrate of lyophilisation for the horse plague virus by C. STELLMANN, S. GHAZARIAN, E. LEFTHERIOTIS, M. KOROURIAN and H. GILBERT.

The physico-chemical and biological study of a substrate of horse plague lyophilized virus, has made it possible to appreciate some parameters of the lyophilisation, and to notice the loss of infectious power and to work out the stability of the product.

Physico-chemisches und biologisches Studium eines lyophiliersubstrat für das Virus der Pferdepest, von C. STELLMANN, S. GHAZARIAN, E. LEFTHERIOTIS, M. KOROURIAN und H. GILBERT.

Das physico-chemische und biologische Studium eines Lyophiliersubstrat für das Virus der Pferdepest hat es ermöglicht gewisse Parameter der Lyophilisation zu schätzen, Verlust an Infektionsvermögen zu berechnen und die Stabilität des Produktes zu chiffrieren.

Estudio físico-químico y biológico del substrato de liofilización para el virus de la peste equina, por C. STELLMANN, S. GHAZARIAN, E. LEFTHERIOTIS, M. KOROURIAN y H. GILBERT.

El estudio físico-químico y biológico de un substrato de virus de la peste equina liofilizado ha permitido estimar ciertos parámetros de la liofilización, apreciar la pérdida del poder infeccioso y cifrar la estabilidad del producto.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERANGER (G.) et JOUBERT (L.): Un nouveau mode de titrage statistique en biologie. *Bull. Soc. Sci. vét. Méd. comp. Lyon*, 1961 **63**, 147, 235. — [2] HAHN (E.) et ROSSOTTI (C.): Different susceptibility to polioviruses of Monkey kidney cells of different ages. *Bull. Ist. Siero. Milan*, 1962, **41**, 9-10, 354. — [3] HAZRATI (A.), OZAWA (Y.): Monovalent live-virus horsesickness vaccine. *Bull. Off. int. Epizoot.*, 1965, **64**, 683. — [4] HERRERO (E.): Le rouge de phénol, indicateur du vide lors de la lyophilisation des vaccins. *Zentbl. Bakt. Pariskde.*, 1935, **198**, 4, 529. — [5] HIATT (C. W.): Kinetics of the inactivation of viruses. *Bact. Rev.*, 1964, **28**, 2, 150. — [6] OZAWA (Y.), HAZRATI (A.), EROL (N.): African Horsesickness live-virus tissue culture vaccine. *Am. J. vet. Res.*, 1965,

26, 110, 154. — [7] OZAWA (Y.), HAZRATI (A.) and BAHRAMI (S.): African horse-sickness live and killed virus tissue culture vaccine. *Proc. 1st Int. Conf. Equine Infectious disease, Stresa, Italie 1966.* — [8] OZAWA (Y.), BAHRAMI (S.): Effects of freezing on Africa horsesickness virus. *Fedn. Proc.*, 1968, 27, 2. — [9] PRECAUSTA (P.), STELLMANN (C.), BORNAREL (P.), TERRE (J.), LEFTHERIOTS (E.): Virus-vaccins associés, lyophilisés contre la maladie de Carré et l'hépatite contagieuse du chien. Symposium de standardisation microbiologique. *Biological Assays Methods*, Londres, 25-27 octobre 1967. — [10] REY (L.): Aspects théoriques et industriels de la lyophilisation. *Actualités scientifique et industrielle* 1316. Edit. Hermann, Paris 1964. — [11] REY (L.): Progrès récents en lyophilisation. *Actualités scientifique et industrielle* 1299. Edit. Hermann, Paris 1962. — [12] REY (L.): *Traité de lyophilisation*. Edit. Hermann, Paris 1960. — [13] WOESE (C.): Thermal inactivation of animal viruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, 83, 4, 741.