

ZV000 1121

Réflexions sur la lyophilisation des produits biologiques sous conditions tropicales

par GILBERT (Y.)

Note transmise par M. MORNET

La stabilisation des produits biologiques et singulièrement des vaccins par la technique de lyophilisation se révèle particulièrement heureuse sous conditions tropicales où l'application de la cryo-dessiccation aux produits biologiques utilisés en médecine vétérinaire permet une action prophylactique accrue contre les épizooties.

Le mode d'élevage, nomade le plus souvent, impose le recours à des méthodes vaccinales ne comportant qu'une seule intervention et conférant une immunité de longue durée. Les vaccins « vivants », (virus modifiés en particulier) répondent parfaitement à ces exigences. Mais la température moyenne élevée, les insuffisances de la chaîne du froid, les distances et la précarité de l'équipement routier en restreignent l'emploi. Des expédients comme l'inoculation sur place d'animaux producteurs de virus modifiés, transportés d'un centre de vaccination à l'autre, avec passage en série du virus, ne peuvent être que provisoires. Il est inutile d'insister sur les inconvénients d'une telle méthode et les avantages qu'offre la possibilité de préparer en laboratoire des stocks de vaccins contrôlés, titrés, d'une stabilité suffisante pour atteindre les points les plus reculés du territoire, présentés sous un faible volume et un poids négligeable.

En zone intertropicale, les avantages de la lyophilisation ont été rapidement reconnus mais les répercussions de l'ambiance ne pouvaient manquer d'imprimer au procédé quelques particularités.

En effet, la zone intertropicale est essentiellement caractérisée par une température moyenne élevée (les maxima

dépassent souvent 40°C) à laquelle peut s'associer sous certaines latitudes et selon la saison, une forte humidité atmosphérique.

A ces facteurs climatiques défavorables s'ajoutent les effets du sous-équipement que connaissent de nombreux territoires à régime similaire.

Il paraît intéressant de résumer les observations recueillies au cours de quelques années de pratique, et de faire connaître les difficultés rencontrées, les solutions retenues et les résultats enregistrés.

A) DIFFICULTÉS RENCONTRÉES

Lyophiliser un produit, c'est, après l'avoir congelé, en extraire l'eau par sublimation sous vide. Il importe donc de disposer d'une source de froid, des moyens de produire et entretenir le vide, et d'appliquer convenablement ces procédés à la réalisation des opérations successives de congélation et dessiccation afin de respecter au maximum les qualités essentielles du produit. Nous envisagerons donc tour à tour les difficultés rencontrées sous conditions tropicales dans la production du froid et du vide, puis au cours de l'opération elle-même.

Appliquée aux travaux de recherches, la lyophilisation connaît les mêmes indications en régions tropicales qu'en zones tempérées. Il est facile de créer à peu de frais autour d'un appareil de faible capacité un microclimat favorable. Par contre assurer régulièrement une production à l'échelle semi-industrielle suscite des problèmes difficiles à résoudre.

1° *Le froid.*

Celui-ci peut être produit économiquement par les seules machines frigorifiques. La glace carbonique n'est pas, sauf exception, fabriquée sur place, et sa préparation à partir du gaz carbonique liquide revient à un prix prohibitif. Les gaz liquéfiés (air et azote liquides) sont encore d'un emploi restreint et coûteux. Sous conditions tropicales, les machines frigorifiques à compresseur fonctionnent avec un mauvais rendement en raison de la température des fluides de refroidissement ; air ou eau. Celle-ci en particulier atteint

couramment 30 à 35°C et l'on observe sur le circuit de refoulement du fluide frigorigène des pressions considérables. La production en frigories subit une baisse sensible.

Les apports de chaleur par rayonnement et conduction sont accrus par l'élévation de la température ambiante, et les performances des appareils sont nettement inférieures à celles enregistrées en climats tempérés.

Il résulte de ce fait une fatigue générale de l'appareillage (compresseur surtout) se manifestant par de fréquents incidents que compliquent les difficultés de se procurer des pièces de rechange et la rareté des spécialistes qualifiés dans la technique des basses températures.

Il semble aussi que dans un but commercial certains constructeurs désireux de concilier des exigences apparemment contradictoires, obtention de performances spectaculaires et prix de vente aussi bas que possible, aient été amenés à « pousser » leurs appareils au détriment de la robustesse et de l'endurance.

2° *Le vide.*

Le problème de la réalisation et de l'entretien du vide est double. Il comporte en effet l'élimination :

a) des gaz permanents (air en particulier) emplissant l'enceinte où s'effectue la lyophilisation, ou pouvant y pénétrer par des défauts d'étanchéité ;

b) de la vapeur d'eau produite par la sublimation de la glace et dont l'évacuation ne peut être assurée par les pompes.

En ce qui concerne les gaz permanents, la production du vide ne pose pas sous conditions tropicales de problèmes particuliers. Les pompes rotatives ou à diffusion fonctionnent parfaitement.

Il faut noter cependant que la fourniture du courant électrique est sujette à des interruptions relativement fréquentes. L'arrêt de la pompe à vide est suivi d'une remontée de l'huile dans le circuit d'aspiration qui fait obstacle au démarrage lors de rétablissement du courant. Il est donc nécessaire de faire assurer une surveillance constante des appareils par un technicien qualifié, dont le recrutement sur place est malaisé.

Le piégeage de la vapeur d'eau est normalement assuré

par une paroi froide, jouant le rôle de pompe à grand débit, car les desséchants chimiques sont à peu près abandonnés.

L'efficacité de ce piège dépend en grande partie de sa température. Plus celle-ci est basse, plus le transfert de la vapeur émise par le produit maintenu à une température déterminée est rapide. Lorsqu'on dessèche un produit pour lequel la sublimation peut s'effectuer à température relativement élevée (-15, -20°C) une vitesse de dessiccation satisfaisante peut être obtenue avec un piège à -40°C. Mais s'il s'agit de matériels à bas point eutectique (-25 à -30°C), et certains produits à dessécher sous conditions tropicales offrent cette particularité, il est nécessaire de disposer d'une paroi froide à très basse température (-60°C par exemple), pour maintenir une pression différentielle suffisante et obtenir la dessiccation dans un temps raisonnable.

Compte tenu des conditions adverses de production du froid, les appareils actuellement construits permettent d'obtenir ici une température au niveau du piège supérieure de 5 à 10°C à celle annoncée pour les régions tempérées. La durée de la dessiccation en est sensiblement prolongée.

L'évaporateur à détente directe semble le moins affecté par les conditions tropicales. Des températures basses peuvent être atteintes par l'emploi d'un seul étage de compression, mais on ne dispose pas d'un volant de froid, comme dans le cas du système à détente indirecte, ou l'évaporateur du groupe frigorifique refroidit une masse de fluide (alcool par exemple). Il est alors nécessaire de recourir à des étages multiples de compression pour obtenir de basses températures. Le fluide refroidi peut aussi être utilisé pour la congélation rapide des produits, et la limitation du réchauffement du matériel en fin de dessiccation. Ce dernier résultat n'est acquis qu'au prix du réchauffement du fluide et par conséquent du piège. Il serait préférable d'alimenter en fluide froid le condenseur et la cuve à dessiccation par des groupes frigorifiques différents, mais cette solution accroît considérablement le prix de revient des appareils.

Le fonctionnement des instruments de contrôle (vide et température) ne semble pas perturbé par les conditions tropicales. Il est seulement à signaler que, sur certains appareils, ils sont fixés à même le châssis, et subissent l'effet des vibrations. Leur réparation et leur réglage posent alors de sérieux problèmes.

3° Déroulement des opérations de lyophilisation.

a) Congélation.

La plupart des appareils étant destinés à la lyophilisation du plasma, leurs installations de congélation rapide sont prévues pour les flacons de grand volume. Par contre la congélation rapide de produits répartis en ampoules ne peut être réalisée. En pays tempérés, on recourt à la congélation en coquille dans un bain d'alcool refroidi par la glace carbonique. En l'absence de cette dernière, les appareils les plus satisfaisants permettent la congélation en culot sur des étagères ou dans un bain d'alcool refroidi. Les mêmes difficultés se rencontrent lors de l'emploi de petits flacons type « Pénicilline ». La congélation rapide n'est pas indispensable à la conservation des bactéries (certaines d'ailleurs sont sensibles au choc thermique) dont on peut compenser la perte par un enrichissement de la suspension initiale ; elle offre par contre un grand intérêt dans la conservation des virus, facilement inactivés par les concentrations salines eutectiques.

Une congélation rapide offre aussi l'avantage de donner au produit une porosité plus grande par la multiplication des cristaux de glace et leur faible dimension. La réhydratation du produit s'effectue alors dans de meilleures conditions.

b) Dessiccation.

Dans les régions tropicales, la lyophilisation s'applique à peu près exclusivement au plasma et aux vaccins (bactéries ou virus). Le plasma, produit relativement stable, et supportant à l'état sec des températures assez élevées, ne pose pas de problèmes particuliers, et la plupart des appareils utilisés sont étudiés pour son traitement. Parmi les vaccins au contraire, certains virus se révèlent sensibles à l'action de la chaleur, même à l'état sec, et sont rapidement inactivés à la température ambiante (souvent comprise entre +30° et +40°C).

Le virus-vaccin bovipestique lapinisé en est un exemple, et sa conservation par lyophilisation a fait l'objet de quelques recherches. A la fin de la dessiccation primaire la sublimation se ralentit, le produit se réchauffe même après l'arrêt du chauffage, et se maintient à la température am-

biente durant toute la durée de la phase terminale amenant le produit à une teneur en humidité résiduelle inférieure à 1 %. Dans une ambiance de + 30°C environ, une baisse de titre supérieure à 1 log. est enregistrée, soit 90 % des unités virulentes. Pour réduire cette perte, on maintient le vaccin à +4°C, et une diminution des unités virulentes de 20 % seulement est observée.

Il est donc essentiel de pouvoir, selon besoin, soit apporter au produit les calories nécessaires à la sublimation, soit maintenir sa température à une valeur déterminée au-dessous de l'ambiance. Dans certains appareils ce dernier résultat est obtenu soit par une circulation de fluide réfrigéré dans les étagères de la chambre à dessiccation, soit par la situation du condenseur autour des plateaux, à l'intérieur de la cuve à dessiccation. Dans ce cas, la température du produit est fonction du seul chauffage.

Le maintien du produit à température relativement basse allonge considérablement le temps nécessaire à l'obtention d'un taux d'humidité résiduelle égal ou mieux inférieur à 1 %.

A la fin de la première phase de dessiccation pendant laquelle le produit est maintenu congelé par le froid résultant de la sublimation de la glace, il reste environ 5 % d'humidité. Le produit est alors réchauffé au-dessus du point de congélation et cette eau extraite par simple distillation sous vide. Son élimination est difficile car il s'agit d'eau adsorbée. Si le produit supporte un chauffage à +40°C, comme le plasma, la dernière phase de la dessiccation dure environ 1/5^e de la durée totale du processus. Par contre, pour un matériel maintenu au-dessous de + 10°C, un taux d'humidité convenable n'est atteint qu'après une période pouvant dépasser en durée la dessiccation primaire.

Ainsi la lyophilisation du virus-vaccin bovipestique lapinisé réparti à la dose de 1 cm³ en ampoules de 1-f mm de diamètre, sur une épaisseur de 8 mm environ, demande 36 heures au total. Durant la première partie de la dessiccation, le vaccin est maintenu à une température de -35°C environ sous un vide de 0,1 mm de mercure environ. Cette phase dure environ 15 heures, puis la pression s'abaisse à 0,05 mm de mercure et se maintient à cette valeur pendant à peu près 15 heures. Enfin la pression atteint 0,03 mm de mercure et la dessiccation est considérée comme terminée. La tem-

pérature du condenseur est de -60°C pendant les 20 dernières heures.

Les dosages d'humidité résiduelle font apparaître une teneur de 0,8 à 0,9 pour 100.

Lors de la sortie du produit, si la différence de température entre celui-ci et l'ambiance est sensible, une condensation importante se produit. Une précaution indispensable est donc de réchauffer le contenu de la cuve avant son ouverture, ou mieux, d'opérer en atmosphère conditionnée.

c) *Problèmes connexes.*

Le plus important est celui posé par le choix du milieu servant d'excipient aux virus. L'étude, effectuée à Dakar, concerne, comme pour la température de dessiccation, le virus-vaccin bovine lapinisé.

Celui-ci est constitué par un broyat de rate et de ganglions mésentériques de lapins infectés, dans du sang défibriné. Une première formule comportait un mélange d'organes, de sang et de solution isotonique de chlorure de sodium. L'influence nocive de ce sel fut vite reconnue, et le seul diluant utilisé reste le sang défibriné. Dans ces conditions, la perte à la lyophilisation peut être ramenée à 20 % environ. En vue d'éviter la saignée cardiaque des lapins, longue et fastidieuse, l'emploi de diluants différents du sang fut envisagé. Les essais, restreints, ont porté d'une part sur une solution isotonique tamponnée additionnée de lactose et peptone et d'autre part sur l'extrait embryonnaire préconisé par J. NAKAMURA. On le prépare en mélangeant à parties égales des embryons de poulet de 17 à 18 jours et une solution de glucose à 1 %. Le tout est broyé et centrifugé. Le surnageant constitue l'extrait embryonnaire.

Les titrages pratiqués avant et après la lyophilisation font apparaître une différence d'un log. environ. On aboutit donc à la perte de 90 % du virus. Dans ces conditions l'emploi du sang demeure le plus avantageux, malgré la présence des globules qui constituent un élément ralentisseur de la dessiccation.

Par contre, d'autres virus, comme celui de la peste équine ou de la maladie de Newcastle, ne subissent qu'une perte infime après lyophilisation dans la solution tamponnée de lactose et phosphate, et résistent aussi à des températures plus élevées.

Le conditionnement du produit s'achève par la fermeture des récipients sous vide ou atmosphère inerte.

Les vaccins fragiles sont jusqu'ici, en règle générale, conservés sous un vide plus ou moins poussé. Quelques essais de conservation sous azote n'ont abouti qu'à des mécomptes, la vitalité du produit étant abolie après une courte période.

Ces échecs semblent imputables à la mauvaise qualité de l'azote employé, renfermant une proportion notable d'impuretés.

L'emploi récent d'azote rectifié, importé d'Europe, promet une conservation équivalente à celle observée sous vide. Les manipulations d'étirement et scellage des ampoules sous vide seraient en ce cas considérablement réduites. De nouveaux essais après une période plus longue de conservation sont nécessaires pour donner une conclusion définitive.

B) AMÉLIORATIONS POSSIBLES

Les solutions aux difficultés rencontrées dans la lyophilisation sous conditions tropicales consistent :

— soit à adapter les appareils aux conditions tropicales, soit à recréer autour des appareils l'ambiance pour laquelle ils ont été conçus.

Dans le premier cas, il faut envisager la construction d'appareils adaptés aux conditions rencontrées dans la zone intertropicale : la puissance frigorifique sera augmentée, l'isolation sera particulièrement étudiée. Un dispositif permettant le refroidissement du fluide (air ou eau) alimentant le condenseur en améliorera le rendement. Pendant toute la durée de l'opération, la température du produit devra être exactement contrôlée, et le système de refroidissement sera de préférence indépendant du piège à vapeur d'eau. Enfin la congélation rapide du produit devra être possible.

En pratique, la demande des régions intertropicales en appareils à lyophiliser demeure limitée. L'étude et la construction de modèles spéciaux ne présenteraient aucun caractère de rentabilité.

La deuxième solution apparaît pour l'instant la seule réalisable, malgré les dépenses relativement élevées qu'elle entraîne. Elle consiste à placer l'appareil dans une chambre

maintenue à la température maxima que peut supporter le produit en fin d'opération sans dénaturation. Ainsi, à Dakar, les appareils fonctionnent dans une chambre à $+6$, $+8^{\circ}\text{C}$, et les effets des conditions tropicales sont à peu près annulés ; seul subsiste le problème de la congélation.

En effet, les apports excessifs de chaleur dus à la température ambiante sont supprimés. Le refroidissement des condenseurs s'effectue dans d'excellentes conditions, soit par de l'air à $+8^{\circ}\text{C}$ soit par de l'eau rafraîchie par un dispositif simple (serpentin à ailettes -- type radiateur d'automobile -- placé sous l'évaporateur de la chambre froide). Par la diminution puis l'arrêt du chauffage à la fin de la première phase de dessiccation on limite le réchauffement du produit au maximum compatible avec sa conservation, qui est la température de l'ambiance. En fin d'opération, l'appareil est rempli d'azote rectifié et le produit se trouve à la même température que la chambre, ce qui évite toute condensation. Les ampoules ou flacons sont bouchés sommairement au caoutchouc, puis scellés définitivement sous vide modéré.

Les dépenses d'équipement sont élevées : isolation de la chambre, équipement frigorifique puissant en raison du fonctionnement des appareils à l'intérieur, mais les dépenses de fonctionnement sont restreintes et largement compensées par les avantages d'un travail en milieu favorable. Les appareils ne semblent nullement affectés par le séjour à cette température, la seule précaution consiste à chauffer les pompes à vide à palettes avant la mise en route à l'aide de lampes à rayons infra-rouges, afin d'éviter les grippages dus à la trop forte viscosité de l'huile à basse température. Un appareil à lyophiliser fonctionne depuis six ans dans ces conditions et a effectué sans incident notable plus de dix mille heures de marche.

C) LIMITES DE LA MÉTHODE

La stabilisation par lyophilisation des produits biologiques n'est cependant pas absolue, et il est nécessaire d'en reconnaître les limites.

En effet, si certains produits (nous envisageons particulièrement les vaccins bactériens ou les virus) supportent après dessiccation des températures relativement élevées,

d'autres restent particulièrement sensibles à la chaleur même en cet état. Les virus-vaccins bovipestiques modifiés exigent ainsi une conservation constante sous glace.

Sans nul doute, ils pourraient supporter une température légèrement supérieure, mais la présence de la glace constitue un critère facile du degré thermométrique. Cette nécessité de conservation sous froid est le principal facteur limitant actuellement l'emploi des virus-vaccins, car l'établissement d'une chaîne du froid pose de sérieux problèmes en régions tropicales. Les zones d'élevage extensif sont caractérisées par un faible peuplement humain, des voies de communications précaires et des distances considérables à parcourir d'un centre à l'autre. Le ravitaillement en glace des équipes de vaccination demande une organisation rigoureuse, des moyens de transport adéquats et entraîne des dépenses élevées, compensées il est vrai par l'abaissement du prix de revient des vaccins et une durée de protection accrue.

D) RÉSULTATS

L'application de la technique de lyophilisation à la conservation des produits biologiques (vaccins en particulier) rend possible sous conditions tropicales l'utilisation de nombreux agents dont la fragilité en interdit l'emploi à l'état frais, en dehors du laboratoire.

Dans le domaine de la médecine vétérinaire, compte tenu des conditions de travail en régions tropicales, le but poursuivi dans la prophylaxie médicale des affections contagieuses est l'obtention d'une immunité d'installation rapide, solide et durable, conférée par une seule injection. Les vaccins dits « vivants » (virus modifiés par passage sur un hôte inhabituel, souches bactériennes avirulentes) répondent parfaitement à ces prescriptions, mais la conservation de leur activité nécessite une stabilisation que seule la lyophilisation a pu apporter jusqu'ici.

Cette opération permet aussi de centraliser la production dans des centres bien équipés, de choisir l'époque favorable à la constitution de stocks qui, conservés à basse température, peuvent être ensuite répartis selon les besoins dans les zones les plus éloignées.

Enfin les vaccins « vivants » offrent l'avantage d'un prix **de revient bien inférieur à celui des vaccins « inactivés »** surtout en ce qui concerne l'immunisation contre les **maladies à virus.**

Tous les vaccins utilisés à l'état sec en régions tempérées sont également lyophilisés en zone tropicale. Les plus répandus sont les vaccins contre les maladies aviaires (virus-vaccins **contre la maladie de Newcastle et la variole aviaire**) vaccin contre **la brucellose bovine, BCG, etc...**

Outre ces affections, sévissent des maladies propres aux zones tropicales ou du moins plus répandues qu'en régions tempérées contre lesquelles sont préparés des vaccins dont certains lyophilisés.

On peut citer ceux contre la blue tongue, la rage (vaccin Flury), la peste bovine, la fièvre de la vallée du Rift, les entéro-toxémies, la lamsiekte, la peste équine, la péripneumonie **contagieuse bovine.**

Les résultats les plus intéressants sont enregistrés dans la lutte contre la peste bovine, grâce à l'emploi des virus vivants modifiés sur chèvre ou sur lapin. Plusieurs millions de doses de ces vaccins sont utilisées chaque année, et certains territoires ont pu, par leur seul emploi, **éliminer la maladie.**

*(Laboratoire Central de l'Elevage
« Georges Curasson », Dakar.)*