

BIBLIOTHÈQUE
CIRAD-EMVT
10, rue P. Curie
94704 MAISONS-ALFORT Cedex



113

ETUDE DE LA CONTAMINATION DES EMBRYONS DE BREBIS
(OVIS ARIES) PAR BRUCELLA OVIS ET DES EMBRYONS DE
CHEVRES (CAPRA HIRCUS) PAR MYCOPLASMA MYCOIDES SS
MYCOIDES (MMM.L.C.)

RENE QUIRIN

MAISONS-ALFORT, LE 7 NOVEMBRE 1990

*Mémoire DES Productions animales
en régions chaudes*

1 INTRODUCTION

2. MATERIELS ET METHODES.....

2.1. Essai ovin

2.1.1. Superovulation et Collecte des embryons

2.1.1.1. Matériel animal

2.1.1.2. Traitement de superovulation et de synchronisation

2.1.1.3. Méthode de collecte des embryons

2.1.1.4. Traitement des embryons

2.1.2. Réalisation et dénombrement des cultures bactériennes

2.1.2.1. Cultures de B.ovis

2.1.2.2. Dénombrement des cultures

2.1.3. Comportement de B.ovis dans le PBS + 20% SVF

2.1.4. Etude de l'adhésion in vitro de B.ovis sur la zone pellucide de l'embryon de brebis.

2.1.4.1. Contamination simple

2.1.4.2. Traitement aux antibiotiques et à la trypsine

2.2. Essai caprin

2.2.1. Collecte des embryons

2.2.1.1. Matériel animal

2.2.1.2. Traitements de synchronisation et de superovulation.

2.2.1.3. Méthode de collecte des embryons

2.2.1.4. Recherche et traitement des embryons

2.2.2. Dénombrement en milieu liquide

2.2.3. Etude de la survie de Mmm.LC dans le PBS additionné de 20% de sérum de veau foetal PBS + 20% SVF.

2.2.3.1. Evaluation de la survie de Mmm.LC dans le PBS + 20% SVF.

2.2.3.2. Etude de la survie de Mmm. LC en fonction du temps, de la température et de la présence d'antibiotique.

2.2.4. Contamination des embryons.

2.2.4.1. Préparation des solutions mères de mycoplasmes

2.2.4.2. Epreuve de contamination in vitro des embryons congelés.

2.2.4.3. Epreuve de contamination in vitro des embryons frais.

3. RESULTATS

3.1. Essai ovin

3.1.1. Collecte des embryons

3.1.2. Cinétique de croissance des cultures de B. ovis dans le PBS + 20% SVF

3.1.3. Résultats des épreuves de contamination des embryons par B. ovis.

3.2. Essai caprin

3.2.1. Collecte des embryons

3.2.2. Dénombrement en milieu liquide

3.2.3. Résultats de survie de Mmm LC dans le PBS + 20% SVF

3.2.3.1. Survie et mise en évidence de la bactérie

3.2.3.2. Etude de la survie de MM LC.

3.2.4. Résultats de contamination des embryons

3.2.4.1. Dénombrement des solutions mères de mycoplasmes

3.2.4.2. Résultats de contamination in vitro des
embryons congelés.

3.2.4.3. Résultats de contamination in vitro des
embryons frais.

4. DISCUSSION

4.1. Essai ovin

4.2. Essai caprin

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé au cours de l'exécution de ce travail et dont je garde le meilleur souvenir.

Je remercie tout particulièrement les personnes qui ont permis sa réalisation et qui m'ont guidé tout au long de ce travail .

Monsieur le Dr Michel THIBIER, Directeur du Laboratoire de Contrôle des Reproducteurs, 13, rue Jouët, B.P. 65, 94703 MAISONS-ALFORT, pour m'avoir accepté dans son laboratoire.

Monsieur le Docteur P.C. LEFEVRE , Chef du Département de Pathologie Infectieuse, IEMVT, 10, rue Pierre Curie, 94704 MAISONS-ALFORT.

Monsieur le Docteur B.GUERIN, Chef du Laboratoire ACSEDIATE, 13, rue Jouët, B.P. 65 , 94703 MAISONS-ALFORT.

Monsieur le Docteur M.NIBART, Chef du service de Transplantation Embryonnaire de l'UNCEIA, 149, rue de Bercy, 75012 PARIS , Cédex

I. INTRODUCTION

L'adhérence de Brucella ovis (B.ovis) sur la zone pellucide de l'embryon de brebis a été récemment rapportée par Wolfe et al., 1988 (1) (2), celle d'Ureaplasma sur la zone pellucide de l'embryon de chèvre l'a été par Anton et al., 1987 et 1989 (3). et Runke et al. sur embryons de bovins.(5)

D'autres travaux effectués sur Brucella abortus et sur "Campylobacter fetus", Mallek et al., 1984 (4) ne mentionnent pas cette adhésion sur l'embryon bovin, observée par ailleurs pour le virus BHV1 (5).

Les buts de ces manipulations sont d'étudier d'une part l'adhésion de B.ovis sur la zone pellucide de l'embryon de brebis et d'autre part, celle de Mycoplasma mycoides subsp- mycoides larges colonies (Mmm.LC) sur l'embryon de chèvre. Ces deux bactéries sont particulièrement pathogènes pour chaque espèce affectée respectivement. B.ovis est l'agent de l'épididymite contagieuse du bélier mais des cas d'avortements ont été rapportés chez la brebis (6) (7). Mmm.LC est d'une part responsable avec M. Capricolum et Mycoplasma agalactiae du syndrome d'agalaxie contagieuse chez la chèvre (8) et d'autre part impliquée dans la pathologie respiratoire (10).

Le transfert embryonnaire, qui facilite considérablement les échanges de gènes et qui se développe chez les petits ruminants entraînerait si ces effets d'adhésion sont vérifiés, un risque sanitaire qui a été par ailleurs soigneusement étudié et pour lequel des mesures réglementaires ont été prises chez les bovins (10).

Cependant, la législation actuelle présente un vide en ce qui concerne les petits ruminants. Ainsi, les études concernant les pouvoirs infectieux potentiels doivent-elles être entreprises afin de vérifier le risque de transmission de certaines maladies liées au transfert d'embryons et de déterminer des méthodes de prophylaxie efficaces.

Par delà l'aspect purement microbiologique, nous abordons à travers ce travail, des problèmes sanitaires qui apparaissent lors d'échanges internationaux.

Il est important de mesurer précisément l'importance de ce risque aussi bien pour se prémunir de l'importation de germes pathogènes que pour éviter d'exporter les germes pathogènes indigènes.

Le transfert embryonnaire qui est pour de nombreux agents pathogènes

une technique de choix sur le plan sanitaire tout au moins chez les bovins, mérite d'être considéré espèce par espèce, en fonctions des particularités de ses embryons qui ne se comportent pas de manière identique vis à vis des agents infectieux (10,12).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Essai Ovin

1.1.1. Collecte des embryons

1.1.1.1. Matériel animal

Les brebis collectées sont des animaux tout venant sur lesquels sont pratiquées des collectes dans des buts variés (bissection d'embryons, récolte d'embryons pour contaminations....). Aussi, les embryons sont traités au fur et à mesure de leur disponibilité et partagés entre les différents groupes de travaux. Cette raison explique qu'il est impossible de donner le nombre exact de brebis collectées et de donner des résultats individuels.

Les races utilisées vont de l'INRA 401 à la race Hampshire sans oublier les croisés.

Tous les animaux utilisés sont au moins des primipares et ne sont pas réformés pour des raisons liées à une pathologie de la reproduction.

Les animaux doivent se trouver dans un état sanitaire correct; ils ont tous été préalablement soumis aux tests sérologiques pour Brucella abortus (Séroagglutination et fixation du complément) et pour Brucella ovis (Fixation du complément) et sont tous négatifs.

L'intervalle de temps minimal entre mise-bas et collecte doit être de 60 jours. Des béliers sont utilisés pour les saillies

Chaque bélier est mis au maximum avec 5 à 6 brebis, surtout pendant

les mois de Mai et Juin où l'induction des chaleurs des brebis ne peut être obtenue que par voie hormonale.

Les béliers sont contrôlés sérologiquement de la même manière que les brebis vis à vis de B. abortus et B. ovis.

1.1.1.2. Traitements de superovulation et de synchronisation

Des éponges d'acétate de fluorogestone (FGA) (Intervet) dosées à 30 mg sont mises en place pour une durée de 12 jours.

Une dose totale de FSH-P (Shering) de 16 mg est administrée en 4 injections successives espacées de 12 heures et en doses décroissantes 6,5,3 et 2 mg. La première injection est réalisée le 11ème jour suivant l'application de l'éponge vaginale.

Les chaleurs apparaissent généralement 24 à 36 heures après le retrait de l'éponge et les saillies sont pratiquées en main si c'est possible et au minimum à deux reprises espacées de 6 à 12 heures.

Lorsque la monte en main n'est pas possible, il est préférable de laisser les béliers avec les brebis dès le retrait de l'éponge.

Le protocole des traitements de synchronisation et de super-ovulation est détaillé dans le Tableau 1.

1.1.1.3. Méthode de collecte des embryons

La méthode de collecte des embryons retenue est chirurgicale.

Une injection de sulfate d'Atropine (0,25 mg/10 kg) est effectuée 20 minutes avant l'anesthésie. Cette dernière est réalisée par une injection intraveineuse de ROMPUN (BAYER) (0,1 ml/10 kg) et l'anesthésie est renouvelée à la demande au cours de l'opération.

La brebis est placée en décubitus dorsal sur une table légèrement inclinée avec la tête vers le bas.

Toutes les précautions d'asepsie sont prises et une incision d'environ 12 cm est réalisée en région prépubienne sur la ligne blanche en contrôlant soigneusement tous les saignements.

L'utérus est extériorisé délicatement et humidifié régulièrement avec du Serum physiologie contenant de la Calciparine (0,3 ml pour 250 ml de serum. Il est maintenu entre les doigts à l'aide de compresses

TABLEAU 1 : Traitements de superovulation et de synchronisation

Date	Heure	Traitement chèvre	Brebis
D0	8h	Pose d'éponge	Pose d'éponge
D10	8h	FSH: 4mg	
	20h	FSH: 4mg	
* D11	8h	FSH: 3mg + Prostagl.	FSH 6 mg
	20h	FSH: 3mg	FSH 5 mg
D12	8h	FSH: 1.5mg + retrait de l'éponge	FSH 3 mg retrait éponge
	20h	FSH: 1.5mg	FSH 2 mg
D13= J0	8h (chaleurs)	FSH: 1.0mg	chaleurs
	14h	I.A.	saillie en main
	20h	FSH: 1mg	ou naturelle
J1	8h	I.A.	
J4	8h	diète hydrique	
J5	8h	diète totale	
J6		collecte d'embryons	

*: la dose de prostaglandine injectée est de 200 ug/animal

D: jours avant les chaleurs

J: jours après les chaleurs; J0 étant le début des chaleurs

mouillées de serum physiologique pour éviter les traumatismes du feuillet séreux, sources d'adhérences.

Une sonde de Foley n°6 est introduite, après avoir ponctionné l'utérus à hauteur du ligament intercornual, et le ballonnet assurant l'étanchéité est gonflé (6 à 8 ml d'air).

Un catheter urinaire pour Chats est introduit à la jonction utéro-tubaire et sert à l'injection du liquide de collecte, il est maintenu fermement entre le pouce et l'index pendant l'injection.

Un volume de 30 à 35 ml de (PBS + 2g d'albumine) chauffé préalablement à 37°C est injecté à l'aide d'une seringue stérile. Ce liquide entraîne les embryons (en principe au stade morula ou jeune blastocyte) qui sont récoltés dans un flacon à la sortie de la sonde de Foley (celle-ci a été préalablement rincée avec du PBS).

L'évaluation de l'efficacité de la collecte se fait en rapportant le nombre d'embryons collectés dans la corne utérine au nombre de corps jaunes comptés sur l'ovaire ipsilatéral.

Dès la fin des collectes des deux cornes, un point séreux est fait à l'endroit de la jonction de l'utérus et ce dernier est réintroduit dans la cavité abdominale. Une suture du plan aponévrotique et du péritoine à l'aide de points en X précède la suture de la peau (points en U séparés).

Un pansement est appliqué sur la plaie afin d'éviter les souillures et une couverture antibiotique de 5 jours est assurée (pénicilline, streptomycine 1M, 1g formes retard (SHOTAPEN N.D. 10 ml).

1.1.1.4. Traitement des embryons.

Le liquide de collecte contenant les embryons est versé dans une boîte de pétri à fond quadrillé et les embryons sont alors recherchés à la loupe binoculaire (x 10 à 40).

Ils sont évalués aussitôt selon des critères morphologiques (11) et tous ceux dont la membrane pellucide n'est pas intacte sont rejetés.

Puis, ils sont soumis à 10 lavages sanitaires, chacun d'eux ayant un rapport de dilution de 1/300. Enfin, ils sont montés en paillettes dans du PBS + 20% de sérum de veau foetal (SVF) en attendant leur utilisation si celle-ci a lieu quelques heures plus tard. Si leur utilisation est prévue pour le lendemain, ils sont réfrigérés dans de la glace fondante et conservés à cette température jusqu'à leur contamination.

2.1.2. Réalisation et dénombrement des cultures bactériennes

2.1.2.1. Culture de Brucella ovis.

Les cultures de Brucella ovis (B.ovis) sont réalisées sur milieu sélectif sans inhibiteur (Annexe 1) à base de GC Medium base.

Les géloses sont coulées en boîtes de Pétri et conservées à 4°C.

Les subcultures sont repiquées tous les 7 jours (clônage et isolement)

Les colonies de B.ovis apparaissent après 3 jours d'incubation (37°C, 10-15%/CO2) et sont nettement visibles après 4 jours. Cependant, le comptage ne se fera qu'après 10 jours de culture.

2.1.2.2. Dénombrement des cultures

Le dénombrement est réalisé en effectuant une galerie de dilutions de 10^{-1} à 10^{-10} dans du milieu de dénombrement et en ensemençant 4 boîtes par dilution. Le comptage est fait sur les boîtes renfermant entre 30 et 300 colonies.

2.1.3. Comportement de B.ovis dans le PBS + 20% SVF

La survie de B.ovis dans le PBS + 20% SVF est étudiée pendant une durée de 24 heures à trois concentrations différentes (Solution mère (SM) titrant environ 10^9 UFC/ml (Unités formant colonies), $SM \times 10^{-3}$ et $SM \times 10^{-6}$).

L'effet de la température et de la présence d'antibiotique a également été étudié.

Les antibiotiques utilisés sont ceux contenus de manière usuelle dans le PBS et aux mêmes concentrations (10^5 U de pénicilline et 50 mg de streptomycine par litre de solution de PBS + 20% SVF ou de PBS + 2% SVF.

Neuf groupes sont réalisés (Tableau 2) : chacune des 3 dilutions réalisées dans le PBS + 20% SVF (SM ; $SM \times 10^{-3}$ et $SM \times 10^{-6}$) à étudier suivant les trois variables retenues.

- PBS + 20% SVF à 37°C + 5%. CO₂
- PBS + 20% SVF + antibiotique à 37°C + 5% CO₂
- PBS + 20% SVF + antibiotique à 4°C + 5% CO₂

TABLEAU 2 : Constitution des groupes pour la cinétique de persistance de "B.ovis" dans le (PBS + 20% SVF).

	antibiotique	absence		présence		présence	
	température (°C)	37°C		37°C		4°C	
Temps (heures)	UFC/ml	SM	10 ⁻³	10 ⁻³	SM	10 ⁻³	10 ⁻⁶
T 0							
T 0,5							
T 1							
T 4							
T 8							
T 18							
T 24							

Après un dénombrement initial, (T0) deux boîtes de pétri par tubes sont faites aux temps : $T_{1/2}$; T_1 ; T_2 ; T_3 ; T_4 ; T_8 ; T_{24} (l'indice étant donné en heures).

2.1.4. Etude de l'adhésion in vitro de B.ovis sur la zone pellucide de l'embryon de brebis.

2.1.4.1. Contamination simple

Le protocole de contamination suivi s'inspire de celui utilisé par Wolfe et al., (1).

Les embryons sont mis successivement dans une solution de PBS + SVF 20% + antibiotique pendant une durée de 2 à 4 heures puis sont mis dans la même solution sans antibiotiques pendant une durée pouvant aller jusqu'à 18 heures si les embryons sont réfrigérés.

Ce n'est qu'à partir de la sortie de ce second bain qu'ils sont soumis à l'épreuve contaminante.

Celle-ci se fait par mise en contact des embryons avec une solution de PBS + 20% SVF avec ou sans antibiotiques et contenant une concentration variable de B.ovis allant de 10^9 à 10^3 UFC/ml.

La durée du contact des embryons avec les bactéries varie de 4 à 24 heures (37°C).

A l'issue de cette épreuve contaminante, les embryons sont soumis à 10 lavages, chacun d'eux avec un rapport de dilution de 1/300.

Dès la fin des lavages, le liquide de lavage est mis en culture sur milieu sélectif pour B.ovis et les boîtes de pétri sont mises à l'étuve (37°C + 5 à 10% CO₂) pendant une durée de 10 jours après lesquels sont effectués les comptages (deux boîtes sont faites par lavage).

Les embryons récoltés après le 10^e lavage sont broyés dans des potters à fond dépoli et le contenu du potter est mis en culture dans du milieu Brain Heart auquel on a ajouté du sérum de veau foetal (5%) (exigence pour la croissance des Brucella).

Le potter est ensuite rincé et le liquide de rinçage est mis à son tour en culture sur une gélose sélective pour B.ovis.

Les démarches suivies sont regroupées dans le "Tableau 3".

2.1.4.2. Traitement à la Gentamycine et à la Trypsine

Pour certains groupes d'embryons, une tentative de contamination

TABLEAU 3: Traitements appliqués aux différents groupes d'embryons

Traitements	groupe d'embryons (nb)	1 (8)	2 (6)	3 (31)	4 (26 ovocytes)	5 (67)
10 lavages après récolte (1/300) PBS + 2% SVF + AB		+	+	+	+	+
Bain PBS + 20% SVF + AB (37°C 5% CO ₂)		2 heures	2 heures	4 heures	4 heures	4 heures
Bain PBS + 20% SVF sans AB		18 heures 37°C 5% CO ₂	18 heures 37°C 5% CO ₂	12 heures 37°C 5% CO ₂	12 heures 4°C	18 heures 4°C
durée épreuve contaminante		4 heures	4 heures	2 heures	4 heures	18 heures
+ AB SM (Titre)		1,01 10 ⁹ UFC/ml				
sans AB			1,74 10 ¹¹ UFC/ml	9,2 10 ⁷ UFC/ml	4,10 ⁷ UFC/ml	2,54 10 ⁹ UFC/ml
Sol de contami- nation lot (nb embryons) et titre (UFC/ml)		= SM	= SM	lot 1 = 9,2.10 ³ lot 2 = 9,2.10 ² lot 3 = 9,2.10 ¹ lot 4 = 9,2. lot 5 = 0,92 T : pas de contam.	lot 1: SM lot 2: SM lot 3: SM	lot 1 : SM lot 2 : SM lot 3 : SM lot 4 : 2,54 10 ⁵
Autre traitement		-	-	-	lot 1: trypsine 0,25% 1' lot 2: genta 30' lot 3 : I	lot 1 genta 30' (5 ug/ml) lot 2 trypsine 0,25% lot 3 : SM lot 4 : SM 10 ⁻⁴
10 lavages/lot + Bouillon Brain Heart		+	+	+	+	+

pour l'étude de l'adhésion sur la zone pellucide a été réalisée, de la même manière mais suivie d'un bain de 30' contenant de la gentamycine (5 ug/ml)

D'autres lots ont subi l'épreuve de contamination classique suivie d'un bain de 1 minute dans du PBS + 20% SVF contenant de la trypsine à 0,25% selon le protocole utilisé par Singh et al., (12)

Les traitements effectués sont exposés dans le Tableau 3.

2.2. Essai caprin

2.2.1. Superovulation et collecte des embryons

2.2.1.1. Matériel animal

Neuf chèvres sont utilisées au cours de la première manipulation et dix au cours de la seconde. La première collecte est réalisée sur 5 chèvres de race Alpine et 4 de race Saanen. La seconde collecte est effectuée sur les mêmes animaux et sur une chèvre supplémentaire de race Saanen.

Toutes les chèvres ont eu au moins une portée, elles se trouvent dans un bon état d'entretien et ne souffrent d'aucun problème pathologique.

L'intervalle de temps minimal entre mise-bas et collecte est de 60 jours.

Des examens sanitaires préalables ont permis de vérifier l'absence de réaction à la tuberculination ainsi qu'aux tests sérologiques de brucellose (*B. abortus*, *B. ovis*), de mycoplasmoses (*Mmm.LC*, *M. agalactiae*, *M. capricolum*) et du CAEV.

2.2.1.2. Traitements de synchronisation et de superovulation

Des éponges vaginales d'Acétate de Fluorogestone (FGA) (Intervet) dosées à 45 mg sont mises en place pour une durée de 12 jours.

Le protocole de superovulation est décrit dans le Tableau 1. Il consiste en 8 injections successives de doses décroissantes de FSH-P (Shering), espacées de 12 heures et totalisant 19 mg d'hormone.

Une injection d'un analogue PGF (200 ug/animal), le cloprosténol (Uniandine ou Estrumate), est pratiquée 24 heures avant le retrait de l'éponge.

L'insémination artificielle (I.A.) est utilisée au cours des deux collectes d'embryons. Elle est pratiquée à 2 reprises (30 et 48 heures après le retrait de l'éponge) avec à chaque insémination 2 doses.

Les paillettes de sperme congelé utilisées proviennent de boucs indemnes de Mmm.LC (absence de réaction sérologique).

La première collecte est réalisée à contre saison (mai) et la seconde est réalisée en début de saison sexuelle (mi-août).

La mise à la diète hydrique est faite 48 heures avant le début de la collecte avec une diète totale de 24 heures.

2.2.1.3. Méthode de collecte des embryons

Les embryons sont collectés par voie chirurgicale à J6 (6 jours après les chaleurs).

L'induction de l'anesthésie est réalisée, après une injection préalable de Sulfate d'Atropine (1mg/40kg), à l'aide de Thiopental Sodique (Nesdonal ND) (8mg/kg). Puis après intubation trachéale, le relai est pris par une anesthésie gazeuse à base d'Halothane (Fluothane ND).

Une fois prises toutes les mesures d'asepsie nécessaires, la chèvre, en décubitus dorsal, est incisée sur la ligne blanche en région pré-pubienne sur une longueur de 12 cm environ. Les saignements du tissu cutané et sous-cutané sont soigneusement contrôlés car ils sont source de formations fibreuses lorsque le sang entre dans la cavité abdominale. L'utérus est extériorisé et ponctionné au niveau du ligament intercornual. Une sonde de Foley n°6 est introduite et gonflée afin d'assurer l'étanchéité et une meilleure collecte du liquide injecté. Au niveau de la jonction utéro-tubaire, une sonde urinaire pour chats est introduite et sert à l'injection du liquide de collecte.

L'injection d'un volume de 30 ml de PBS préalablement chauffé à une température de 37°C permet une récolte satisfaisante des embryons. Cette récolte est évaluée par rapport au nombre de corps jaunes comptés sur l'ovaire correspondant au côté où se fait la collecte.

Après la collecte, le chirurgien assure la suture de la séreuse de l'utérus à l'endroit de la ponction avec la sonde de Foley. Puis, une suture de la paroi abdominale à l'aide de points en X précède la suture cutanée qui achève l'opération. Une couverture antibiotique de 5 jours (Shotapen) est assurée pour prévenir tout problème post-opératoire.

2.2.1.4. Recherche et traitement des embryons

Dès la récolte du liquide de collecte, les embryons sont recherchés et aussitôt triés, selon des critères morphologiques, en trois groupes : bons, régénérés et non fécondés. L'opération se fait sous une loupe binoculaire (grossissement x 10 à x 40) dans des boîtes de pétri à fond quadrillé.

Puis, les embryons sont soumis aux 10 lavages sanitaires avant d'être répartis en paillettes.

Enfin, selon le cas, ils sont soit congelés dans l'azote liquide, soit réfrigérés dans de la glace fondante en attendant leur utilisation ou contaminés aussitôt.

2.2.2. Dénombrement en milieu liquide

Une galerie de dilutions croissantes allant de 10^{-1} à 10^{-12} est réalisée à partir d'une culture de 48 heures en milieu T 10 (Annexe 2). Ces tubes sont mis dans l'étuve à 37°C et la lecture des résultats s'effectue par simple observation de l'apparition d'un trouble à partir de 24 heures.

Le critère retenu est le titre donné par la dernière dilution où une croissance bactérienne est observée.

La méthode de dénombrement des mycoplasmes utilisée ici est celle décrite en milieu liquide (Taylor 1965, table en Annexe 3).

Cette méthode consiste à réaliser des dilutions successives et des sous-dilutions dans du milieu glucosé (voir Annexe 3) dans la zone limite de présence de bactéries. Un calcul de probabilité, synthétisé par la table de Taylor permet d'estimer le titre de la solution initiale. La table de Taylor donne le titre de la solution en fonction du nombre de tubes ayant fait virer le rouge de phénol par hydrolyse du glucose.

2.2.3. Etude de la survie de S Mmm.LC dans le PBS additionné de 20% de sérum de veau foetal : PBS + 20% SVF.

2.2.3.1. Evaluation de la survie de Mmm.LC dans le PBS + 20% SVF.

Une culture de mycoplasmes de 24 heures réalisée dans du milieu T10 est placée dans du PBS + 20% SVF et soumise aux dilutions suivantes :

$$A = 2 \times 10^{-2} (1/50) \quad B = 4 \times 10^{-3} (1/250) \quad C = 8 \times 10^{-3} (1/1250) \quad D = 16 \times 10^{-5} (1/6150)$$

Après 24 heures d'incubation à 37°C. 1 goutte de chacun des tubes A,B,C,D, est ensemencée sur des boîtes de pétri contenant de la gélose tryptose à 10% de serum de cheval.

Les boîtes de pétri sont mises à l'étude à 37°C, les colonies apparaissent à partir de 24 heures et la lecture définitive se fait le 5ème jour.

2.2.3.2. Etude de la survie de Mmm. LC dans : (PBS + 20% SVF) en fonction du temps , de la température et de la présence d'antibiotiques.

* en fonction du temps: par 4 dilutions successives au 1/10e dans du (PBS + 20% SVF) d'une culture initiale de Mmm.LC en milieu T10 de titre estimé à 10^9 UFC/ml, il est possible d'obtenir une culture de mycoplasmes (de titre à définir) sans avoir à tenir compte de la présence de la fraction négligeable de milieu T10 restante (0.01%).

Quinze ml de cette solution mère sont répartis en trois tubes contenant respectivement 8; 3.5 et 3.5 ml.

Un titrage initial : temps "0" (T₀) est réalisé selon la méthode de dénombrement déjà décrite, puis des titrages sont faits à T₂; T₄; T₈; T₁₂; T₂₄; les indices représentent les heures (voir " Tableau 4 "); ce tableau comporte également les sous-dilutions faites pour le tube placé 48 heures à 4°C°.

Le tube servant à réaliser cette cinétique (8 ml) est entreposé à 37°C pendant la durée de la manipulation

* en fonction de la température: le second tube (3,5 ml) est placé dès T₀ au réfrigérateur à 4°C pour 48 heures.

* en fonction de la présence d'antibiotique : le troisième tube va servir à évaluer la sensibilité de la bactérie à la streptomycine. Une solution d'une concentration de 50 ug/ml de streptomycine (dose utilisée classiquement dans les liquides de collecte) est réalisée et après 24 heures à 37°C, un titrage par lecture de la dernière dilution positive donnera la quantité de bactéries restantes.

TABLEAU 4 : Galeries de sous dilutions utilisées pour le titrage lors de la cinétique de croissance de Mmm.LC.

Sous-dilution	Temps	- 1	- 2	- 3	- 4	- 5	- 6	- 7	- 8	- 9	- 10
(heures)											
	0				*	*	*				
	2				*	*	*				
	4				*	*	*				
	8					*	*	*			
	12					*	*	*			
	24				*	*	*				
	48 (4°C)				*	*	*				

*: dilutions pour lesquelles ont été effectuées des sous-galeries de test de l'hydrolyse en glucose.

2.2.4. Contamination des embryons

2.2.4.1. Préparation des solutions mères de mycoplasmes

Les dilutions de mycoplasmes sont préparées à l'avance dans du PBS + 20% SVF et conservées à 4°C. Le titrage est réalisé sur la première dilution utilisée.

Les trois concentrations retenues pour l'expérience sont 10^4 , 10^6 et 10^8 UFC/ml (Unités formant colonie).

2.2.4.2. Epreuve de contamination in vitro des embryons congelés

Les embryons qui ont été conservés dans de l'azote liquide sont décongelés après passage dans un bain de saccharose 0,25 M. Ils sont ensuite examinés à la loupe binoculaire et classés en trois lots distincts (voir 2.2.1.4.). Tous ceux dont la membrane pellucide n'est plus intacte sont supprimés.

Dans chaque lot, les embryons sont séparés en quatre groupes selon le Tableau 3. Trois de ces quatre groupes (A, B, C) sont mis en contact avec les trois solutions de PBS + 20% SVF contaminées aux trois titres retenus pendant une durée de 12 heures. A l'issue de ces 12 heures de contact, les embryons sont soumis lot par lot à 10 lavages successifs avec un rapport de dilution de 1/300.

Une recherche de mycoplasmes est effectuée sur tous les liquides de lavage par mise en culture dans du milieu T10.

Les embryons sont également mis en culture dans des tubes de milieu T 10 où une recherche de mycoplasmes est effectuée.

Les embryons témoins serviront à vérifier l'absence de mycoplasmes dans le tractus génital de la chèvre au moment de la collecte.

2.2.4.3. Epreuve de contamination in vitro des embryons frais.

Les embryons de la seconde collecte sont soumis aux 10 lavages réglementaires, le jour de la collecte puis réfrigérés à 4°C jusqu'à leur utilisation. Le traitement qu'ils subissent est ensuite rigoureusement identique à celui des embryons congelés à partir de la répartition en 12 groupes (Tableau 3).

TABLEAU 5 : Répartition en lots des embryons selon leurs caractères morphologiques et le titre de la solution contaminante.

a: lot d'embryons congelés : nombre d'embryons utilisés

		Concentration :			
		A: 10^8	B: 10^6	C: 10^4	T
Etat					
1:	bons embryons	3	4	4	4
2:	embryons dég.	8	9	9	11
3:	" non fécondés	6	6	7	7

b: lot d'embryons frais: nombre d'embryons utilisés

		Concentration:			
		A	B	C	T
Etat:					
1:	non fécondés	18	16	17	14
2:	dégénérés	5	5	5	5
3:	bons	14	7	4	5

TABLEAU 6 : Cinétique de persistance de B.ovis dans le PBS + 20% SBF en fonction de la concentration, la température et la présence d'antibiotique.

antibiotique		sans			avec			avec		
temps (°C)		37			37			4		
Temps (heures)	UFC/ml	SM	SM 10 ⁻³	SM 10 ⁻⁶	SM	SM 10 ⁻³	SM 10 ⁻⁶	SM	SM 10 ⁻³	SM 10 ⁻⁶
	boîte									
T0	1	+++	+++	374	+++	++	19	+++	++	13
	2	+++	+++	350	+++	++	24	+++	+++	5
T0 0,5	1	+++	+++	341	+++	++	15	+++	++	8
	2	+++	+++	215	+++	++	7	+++	++	6
T1	1	+++	+++	370	+++	++ (I)	3	+++	++	3
	2	+++	+++	365	+++	++ (I)	4	+++	++	10
T4	1	+++	+++	pas de	+++	++ (I)	4	+++	++	6
	2	+++	+++	résultat	+++	++ (I)	1	+++	++	11
T8	1	+++	+++	341	+++	++ (I)	1	+++	++	1
	2	+++	+++	385	+++	++ (I)	0	+++	++	7
T18	1	+++	+++	395	+++	21	0	+++	++	0
	2	+++	+++	387	+++	20	0	+++	++	0
T24	1	+++	+++	412	+++	11	0	+++	++	0
	2	+++	+++	390	+++	21	0	+++	++	0

(SM) = 3,6 10⁹UFC/ml

+++ : nappe de B.ovis

++ : incomptable (500 à 1000 colonies)

(I) : inhibition de croissance sur une partie de la boîte

3. RESULTATS

3.1. Essai ovin

3.1.1. Collecte des embryons

La dernière collecte, pour laquelle tous les embryons ont été consacrés à notre étude, a donné un nombre moyen d'embryons collectés par brebis (sur race Hampshire) de 7,8 avec 3,5 embryons viables par brebis, 2,9 dégénérés et 1,4 non fécondés. Le taux de collecte a été de 81%

3.1.2. Cinétique de croissance des cultures de B.ovis dans le (PBS + 20% SVF).

La cinétique de croissance en fonction de la température, la présence ou l'absence d'antibiotique et en fonction du titre initial est exposée dans le Tableau 6.

La solution mère a pour titre $3,62 \cdot 10^9$ UFC/ml:

3.1.3. Résultats des épreuves de contamination des embryons par B.ovis.

Les résultats sont exposés dans le Tableau 7: Ils synthétisent toutes les données obtenues aussi bien par épreuve de contamination simple qu'après les bains aux antibiotiques et à la trypsine.

Les résultats confirment l'adhésion de B.ovis à la zone pellucide des embryons ovins surtout dans les concentrations importantes.

Il semble que le bain antibiotique de 30 minutes ne soit pas suffisant pour détruire toutes les bactéries et que le bain de trypsine soit également inefficace.

Tous les résultats positifs ont été confirmés par un état frais, un Gram ainsi qu'un test à la catalase et un test à l'oxydase.

3.2. Essai caprin

3.2.1. Collecte des embryons

Les embryons récoltés lors de la première collecte ont tous été congelés dans l'azote liquide en milieu PBS + 1,5 M d'éthylène-glycol.

TABLEAU 7 : Résultats des épreuves de contamination des différents groupes d'embryons.

groupe (nb)	1 (8)	2 (6)	3 (31)	4/26 ovocytes	5 (67)
milieu de d'embryons					
contami- nation	PBS + 20% SVF + antibiot	PBS + 20% SVF sans antibiot	PBS + 20% SVF sans antibiot	PBS + 20% SVF	PBS + 20% SVF sans antibiotique
Temps contact de sol de contam.	4h	4h	20h à 37° puis 18h à 4°C	4h	20 heures
Titre (B.ovis)	1,01 10 ⁹ UFC/ml	1,74 10 ¹¹ UFC/ml	de 10 à 10 ⁴ UCF/ml + 1 témoin		2,54 10 ⁹ 2,54 10 ⁹ 2,54 10 ⁹ 2,54 10 ⁵
mise en culture des liquides de lavage					1: témoin + genta + trypsine SM SM
					3 lots 2: genta 30' mycine 30' 1 1
L1	+++	+++	0	80 0 0	++ ++ +++ ++
L2	+++	+++		3 ++	++ ++ +++ 11,5
L3	++	++		0 ++	++ 10 ++ 1,5
L4	++	++			++ 1,5 ++ 0
L5	45	155			85 1 contaminé 0
L6	20	85			18,5 0 ++ 0
L7	50	88			3 0 14,5 0
L8	7,5	70			0,5 0 0 0
L9	3	30			1 0,5 0,5 0
L10	++	105	0	0 0 0	0,5 0 1 0
broyage des d'embryons sur boîte de Pétri	22 12	19 21	0 0	0 0 0	25 17 13 0
rinçage du broyat sur bouillon Brain Heart	- pas de culture car dans le bouillon	- pas de serum	0	0	+ + contaminé -

+++ : Culture en nappe

++ : colonies isolées incomptables (> 500)

L'échantillon de chèvres collectées est hétérogène par la race (5 Alpines et 4 Saanen) et par l'âge : les Saanen sont des primipares alors que les Alpines sont des multipares (plus de quatre mises bas).

Les résultats, toutes chèvres confondues, donnent une moyenne de corps jaunes de 15,9 par animal et une moyenne de follicules de 1,3 par animal.

La moyenne d'embryons récoltés est de 13,3 par chèvre avec un nombre d'embryons viables de 7,9 et une moyenne confondue de dégénérés et de non fécondés de 5,4 par animal.

Le Tableau 8 rassemblent les résultats obtenus lors de la première collecte en contre saison en fonction de la race (Saanen versus Alpine).

Les résultats de la seconde collecte sont rassemblés dans le Tableau 9.

3.2.2. Dénombrement en milieu liquide

La galerie de dilutions effectuées en milieu T10 permet de lire à 1 log près le titre de la culture initiale : le dernier tube présentant un trouble est celui de la dilution 10^{-9} (titre entre 10^9 et 9×10^8).

Dans ce cas, les sous dilutions n'ont pas été réalisées pour le milieu T10 ; elles l'ont été pour les cultures dans le milieu PBS + 20% SVF.

3.2.3. Résultats et survie de Mmm.LC dans le (PBS + 20% SVF)

3.2.3.1. Survie et mise en évidence de la bactérie.

Le protocole employé pour vérifier la possibilité de résistance de Mmm.LC dans le (PBS + 20% SBF) ne permet pas d'évaluer après 24 heures de culture, la présence ou non de bactéries (le PBS additionné de SVF étant trouble de nature) et c'est la raison qui engendre le recours à l'ensemencement sur un milieu solide.

Les 4 boîtes réalisées à partir des 4 tubes présentent toutes, après 24 heures d'incubation, de nombreuses colonies de mycoplasmes.

La boîte ensemencée à la dilution : 16×10^{-5} présente un nombre de colonies incomptable (supérieur à 1000 sur la boîte).

3.2.3.2. Etude de la survie de Mmm.LC

Les résultats de cette manipulation sont présentés dans les

TABLEAU 8 : Collecte des embryons (première récolte)

n°	race	form. ovariennes		embryons			
		nb.CJ/nb	foll.	viables/dég./non féc/total			
205	Saanen	24	0	2	0	14	16
618	Alpine	20	0	23	1	0	24
219	Saanen	15	0	6	1	6	13
217	Saanen	13	0	3	1	5	9
621	Saanen	10	0	8	0	0	8
515	Alpine	4	2	2	1	0	3
007	Alpine	18	8	13	0	6	19
619	Alpine	23	2	7	0	4	11
525	Alpine	16	0	7	0	10	17
Total:		143	12	71	4	45	120
Moyenne:		15.9	1.3	7.9	5.4		13.3

TABEAU 1 : Résultats de superovulation, de collecte et de qualité
des embryons en fonction de la race en contre-saison
(Saanen et Alpine).

Critères	Race	
	Saanen (4)	Alpine (5)
Nombre moyen de CJ:	15,5	15,2
Nombre moyen de follicules:	0	2,4
Nombre moyen d'embryons:	11,5	14,8
Taux de collecte:	74%	91%
Nb.moyen d'embryons viables:	4,75	10,4
Taux de viabilité:	41%	70%

Tableaux 10 et 11.

Le premier donne les dilutions où poussent les mycoplasmes en fonction du temps, de la température (à 4°C après 48 heures ou réfrigérateur) et après 24 heures en présence de streptomycine.

Le second donne le résultat du dénombrement des sous-galeries avec le calcul du titre selon la table de Taylor (Annexe 3).

Une courbe du titre de la solution (logarithme décimal du titre) en fonction du temps (heure) peut être tracée et permet de constater une très légère augmentation de ce titre (voir Figure 1).

En effet, le titre passe de $11,0 \times 10^4$ à 170×10^4 après 12 heures, ce qui représente en échelle logarithmique une croissance de 1 log.

Cependant, le titre a tendance à diminuer après 24 heures par rapport à son maximum de 12 heures et il passe à $92,0 \times 10^4$ ce qui représente 5,96 en échelle logarithmique.

* en fonction de la température:

Lorsqu'on compare le titre initial et le titre de la solution après 48 heures à 4°C, il apparaît une décroissance de 0.14 en échelle logarithmique.

* en fonction de la présence d'antibiotique

Enfin, la galerie de dilutions réalisée sur la solution dans laquelle a été rajouté de la streptomycine donne une croissance jusqu'à 10^{-6} après 24 heures de contact.

Un dénombrement précis n'a pas été fait dans ce cas.

3.2.4. Résultats de contamination des embryons

3.2.4.1. Dénombrement des solutions mères de mycoplasmes

Le dénombrement des cultures de mycoplasmes pour contaminer le lot d'embryons frais donne selon la même technique (décrite en : 1.2.2.) un résultat de 1.7×10^8 UFC/ml. Les trois lots ont donc pour concentration respective: le lot A : 17.10^8 le lot B : $1,7 \times 10^6$ et enfin le lot C : $1,7 \times 10^4$. UFC/ml.

Le dénombrement de la culture destinée à contaminer les embryons congelés donne pour le lot A $2,3 \times 10^7$, pour le lot B : $2,3 \times 10^5$ et enfin

TABLEAU 10 : Résultats de survie de Mmm.LC en fonction du temps, de la température et de la présence d'antibiotique.

Temps (heure)	Dilution culture	0	2	4	8	12	24	48 *	ab **
	-1	+	+	+	+	+	+	+	+
	-2	+	+	+	+	+	+	+	+
	-3	+	+	+	+	+	+	+	+
	-4	+	+	+	+	+	+	+	+
	-5	+	+	+	+	+	+	+	+
	-6	+	-	+	+	+	+	+	+
	-7	-	-	-	-	-	-	-	-
	-8	-	-	-	+	-	-	-	-
	-9	-	-	-	-	-	-	-	-
	-10	-	-	-	-	-	-	-	-

*: 48 représente: solution mère mise en culture 48h à 4°C

** : ab représente la solution mère mise en culture 24h avec streptomycine
il n'a pas été fait de sous-galerie.

TABEAU 11 : Titre de la culture par lecture des sous-galeries selon la table de Taylor

Temps	Dilution utilisée	(Nombre de tubes positifs pour les sous-dilutions en hydrolyse du glucose)				Titre (UFC/ml)
		-4	-5	-6	7	
T0		5	3	1		11.0×10^4
T2		5	5	0		24.0×10^4
T4		5	5	0		24.0×10^4
T8			5	5	0	23×10^4
T12			5	4	1	170×10^4
T24		5	5	3		92.0×10^4
(4°C)						
T48		5	3	0		7.9×10^4

TABLEAU 12 : Résultats qualitatifs de la présence de Mmm.LC
dans les 10 liquides de lavage et sur les embryons
congelés.

L A V A G E S												embryons (nb)	Totaux/Groupe
Lots	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
A1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	(3)	17
A2	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	(8)	
A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(6)	
B1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	(4)	19
B2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	(9)	
B3	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	(6)	
C1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(4)	20
C2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	(9)	
C3	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	(7)	
T1											-	(4)	22
T2											-	(11)	
T3											-	(7)	

Dans les lots : 1= bons embryons; 2= dégénérés; 3=non fécondés

A= 2.3×10^7 ; B= 2.3×10^5 ; C= 2.3×10^3

+ = croissance de Mmm-LC

- = pas de croissance

TABLEAU 13 : Résultats qualitatifs de la présence de Mmm.LC
dans les 10 lavages et sur les embryons frais.

	L A V A G E S												
Lot	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	embryons (nb)	Totaux/groupe	
A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(18)	37
A2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	(5)	
A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(14)	
B1	+	+	+	+	+	+	+	c	-	-	+	(16)	28
B2	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	(5)	
B3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	(7)	
C1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	(17)	26
C2	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	(5)	
C3	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	(4)	
T1											-	(14)	24
T2											c	(5)	
T3											-	(5)	

Dans ces lots: A= 1.7×10^8 , B= 1.7×10^6 , C= 1.7×10^4 ,

1 : non fécondés; 2: dégénérés; 3=bons

+ = croissance de Mmm.LC

- : pas de croissance

c : contamination rendant la lecture illisible

pour le lot C : 2,3 10 CFU/ml.

3.2.4.2. Résultats de contamination in vitro des embryons congelés.

Les embryons décongelés donnent après une contamination de 12 heures aux différentes concentrations rapportées dans 3241 les résultats exposés dans le Tableau : 10.

Les lots sont symbolisés par la numération définie dans le Tableau 3 (a).

Les résultats sont exposés pour chaque lavage et pour les embryons mis dans du milieu T10 après la série des 10 lavages. Ils sont uniquement qualitatifs et ne donnent aucun renseignement sur les quantités de Mmm-LC retrouvées.

La confirmation de l'identification de Mmm. LC a été réalisée sur les derniers lavages positifs ainsi que tous les lavages contaminés ou douteux à l'état frais par le passage sur boîte de pétri.

3.2.4.3. Résultats de contamination in vitro des embryons frais.

Les résultats des lots d'embryons frais (numérotation définie par le Tableau 3 (b) sont exposés dans le Tableau 13.

4. DISCUSSION

4.1. Essai ovin

4.1.1. Collecte des embryons

Les résultats obtenus en race Hampshire ne sont pas très bons par rapport à ceux auxquels on s'attendait pour une superovulation. Un taux relativement élevé d'embryons non fécondés (ovocytes) est obtenu. Deux explications peuvent éclaircir ces observations : la race Hampshire n'est pas une race très prolifique et dans ce cas, un facteur stress

relativement important a pu intervenir car les animaux sur lesquels nous sommes intervenus n'ont pas l'habitude d'être manipulés.

Des résultats ponctuels meilleurs ont été obtenus sur la race INRA 401 réputée par ailleurs pour sa prolificité. Ces résultats ne permettent pas une analyse comparée vu la taille trop réduite des échantillons.

4.1.2. Croissance de B.ovis dans le (PBS + 20% SVF).

Nous notons une très légère augmentation du titre qui n'est pas représentative d'une croissance mais tout au moins de la persistance des bactéries dans le milieu lorsque celles-ci sont stockées sans antibiotique à 37°C.

En revanche, en présence d'antibiotiques, on a 4°C, nous notons une légère diminution de la concentration bactérienne. Pour des concentrations de $3,6 \cdot 10^3$ colonies au départ, nous observons une mort des bactéries après 18 heures de culture, que ce soit à 37°C ou à 4°C dans le PBS + 20% SVF + AB.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de la streptomycine étant pourtant inférieure à la concentration présente dans le milieu (50 ug/ml), on peut s'interroger sur les concentrations à rajouter ou sur le choix de l'antibiotique lorsque le titre en brucella dépasse 10^4 CFU/ml.

Cette observation a suscité le choix de la gentamycine dans d'autres manipulations pour étudier la possibilité de se débarrasser de B.ovis de manière sûr après une collecte (CMI: <0,25 ug/ml).

Dans le 5ème lot d'embryons, nous nous apercevons que la gentamycine, à la dose utilisée (5 ug/ml) n'est pas efficace et qu'on retrouve des colonies de B.ovis sur le broyat des embryons et dans le rinçage.

De même, l'action de la trypsine à 0,25% pendant une minute n'a pas eu d'effet satisfaisant sur la destruction des B.ovis.

Dans ce cas, une action prolongée pourrait être étudiée mais elle devrait être suivie par l'étude de la survie de l'embryon.

Deux problèmes sont apparus au cours de la manipulation, le lot 3 qui a été contaminé 18 heures à 4°C avec des solutions contenant de 10 à 10^4 B.ovis par ml ne présente aucun lavage positif. Il y a eu mort de toutes les bactéries. Ceci pourrait s'expliquer par la température mais

dans ce cas, le milieu ne contenait pas d'antibiotique (comme dans la cinétique , Tableau).

En fait, comme dans le lot 4 du 5ème groupe, on s'aperçoit que lorsque la contamination est faible (lot 5 : $2,54 \cdot 10^5$ UFC/ml) ; (Groupes 3: 10^4 UFC/ml) ou lorsque la phase de contamination est longue comme dans le lot 3, les bactéries meurent peu à peu dans le milieu et n'adhèrent plus de manière aussi forte à l'embryon.

On peut alors s'interroger sur l'éventualité de la présence de B.ovis au moment de la collecte et à des doses aussi importantes (10^9 UFC/ml) dans les cornes utérines de la brebis.

La brebis, contaminée avec une telle dose de B.ovis est elle toujours fertile? Dans l'éventualité d'une contamination lors de la monte, il est peu probable que le sperme du bélier contaminant soit fécondant et dans l'hypothèse d'une double monte, la première infectante et la seconde par un animal sain et fécondant, il reste à montrer que les spermatozoïdes sont capables de "transporter" les bactéries au niveau de l'oviducte sachant qu'elles ont été déposées au niveau du cervix et qu'elles sont immobiles.

Une contamination par voie vaginale de la brebis le jour des chaleurs pourrait être réalisée afin de déterminer les concentrations de B.ovis retrouvées au niveau de l'oviducte 6 jours après.

En conclusion, l'adhérence de B. ovis sur la zone pellucide de l'embryon de brebis est confirmée mais les conditions de l'éventualité de la contamination restent à définir. Par ailleurs, il est important d'établir avec précision les mesures à prendre (si elles existent) sur des lots d'embryons inconnus ou suspects en matière de prophylaxie contre B.ovis.

4.2. Essai caprin

4.2.1. Collecte des embryons

La collecte des embryons a été réalisée sur des chèvres de réforme destinées après l'expérimentation à l'abattage. Aussi, nous ne nous sommes pas préoccupés d'une éventuelle répétabilité des collectes et c'est ce qui a justifié le choix de la technique chirurgicale par rapport à l'endoscopie utilisée fréquemment pour les petits ruminants.

Les résultats montrent une différence raciale qui semble relativement importante pour certains critères tels que le taux de collecte, le nombre moyen d'embryons viables et le taux de viabilité.

Cependant, nous nous contenterons de rester descriptifs et de ne pas analyser statistiquement ces données pour les raisons suivantes :

- les échantillons sont très petits : 4 et 5 animaux respectivement pour les Alpines et pour les Saanen.
- les échantillons ne sont pas homogènes entre eux car les Alpines sont toutes des chèvres adultes et ont par ce fait un tractus génital très développé alors que les Saanen sont des primipares avec un tractus génital peu développé qui nous a posé des problèmes de collecte ce qui explique le taux de collecte inférieur à celui observé chez les alpines.

4.2.2. Survie de Mmm.LC dans le PBS + 20% SVF

4.2.2.1. La première expérimentation faite par dilutions successives et passage sur boîte de pétri prouve la survie de Mmm.LC dans le PBS + 20% SVF. Ce résultat n'est pas étonnant, bien que le milieu soit éloigné du milieu classique de culture des mycoplasmes, le T10, car le sérum de veau fœtal apporte les stéroïdes nécessaires à la croissance des mycoplasmes.

4.2.2.2. Ce résultat sommaire a permis d'envisager la cinétique dont les résultats figurent sur le Tableau 11 et sur la Figure 1.

Il est possible de noter une augmentation du titre de l'ordre de 1 logarithme après 12 heures de culture mais cette augmentation ne persiste pas et on observe une diminution par rapport à ce maximum après la 24^{ème} heure.

Globalement, les résultats obtenus nous permettent d'effectuer une contamination pendant une durée de 12 heures sans avoir à diluer les solutions contaminantes au cours de celle-ci.

Un autre argument vient étayer cette observation : avant la contamination, les solutions mères sont conservées 48 heures à 4°C. Au cours de cette conservation, on observe une légère diminution du titre (0,14 en échelle logarithmique). Comme le dénombrement des solutions mères est réalisé avant la mise à 4°C, l'augmentation du titre de la solution placée à 37°C est compensée partiellement par la diminution préalable lors du passage à 4°C. Aussi, ne tiendrons nous pas compte de cette variation du

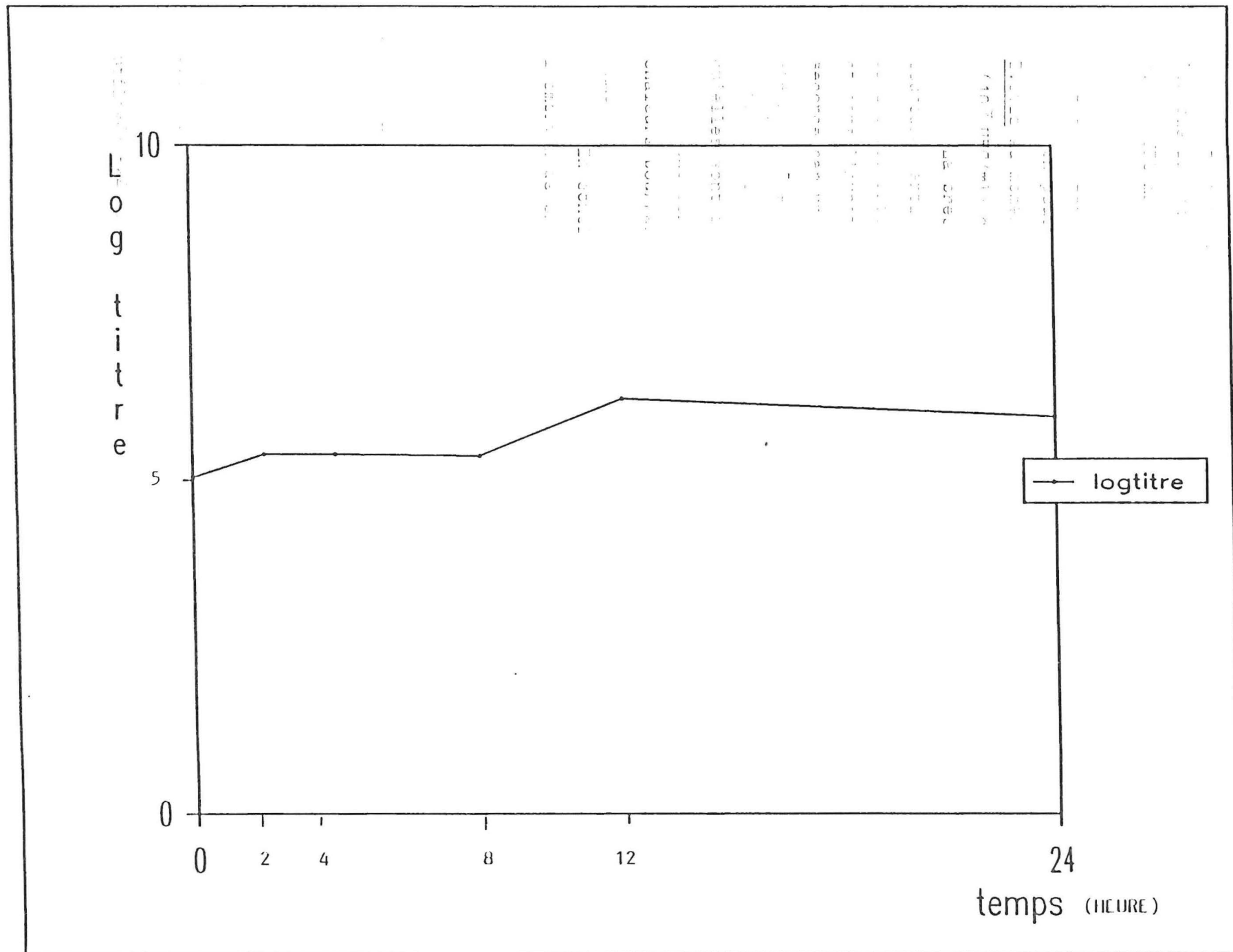


Figure 1: Courbe de croissance de Hum.L.v. log (titre) en fonction du temps en heure.

titre (inférieure à 1 log) d'autant plus que nous opérons à trois dilutions différentes.

Enfin, nous constatons une survie de Mmm.LC en présence de streptomycine après 24 heures de contact et jusqu'à une dilution élevée.

Ceci prouve d'une part la résistance de la souche de Mmm.LC utilisée à la streptomycine mais également la possibilité de survie de mycoplasmes dans le milieu de collecte où la concentration d'antibiotique utilisée est la même que celle retenue dans l'expérimentation.

4.2.3. Résultats de contamination des embryons

Les deux lots d'embryons présentent des caractéristiques similaires vis à vis de leur contamination par Mmm.LC.

On retrouve pour chaque lot des embryons contaminés après 10 lavages dans un rapport de 1/300 pour une contamination de $2,3 \cdot 10^8$ et $2,3 \cdot 10^6$ en ce qui concerne les embryons congelés et de $1,7 \cdot 10^8$, $1,7 \cdot 10^6$ et $1,7 \cdot 10^4$ pour les embryons frais.

Dans chaque lot, on observe que la contamination des liquides de lavage diminue en fonction du nombre de lavage sauf si la contamination de départ a été faite dans des concentrations élevées (groupes A). Cependant, cette diminution ne préjuge en aucun cas sur la stérilité des embryons : lots B1 et B3 des embryons congelés, lots B1, B2 et C1, C2 des embryons frais.

L'explication qu'on peut apporter à ce phénomène est confortée par les propriétés d'adhésivité connues des mycoplasmes. Il semble que les bactéries adhèrent à la surface des embryons de manière plus ou moins intense et que sous l'effet d'une agitation, il se produise un certain relargage comme nous l'observons par exemple dans le 10^e lavage du lot B1 des embryons congelés ou dans les 8 et 10^e lavages du lot B2 des embryons frais.

En conclusion, nous ne pouvons que souligner le danger lié au transfert d'embryons caprins dont les donneuses n'auraient pas été rigoureusement contrôlées. Notons par ailleurs qu'il n'existe pas dans la littérature de référence relatant la présence de mycoplasmes dans le tractus génital caprin au moment de la fécondation et dans les jours suivants. Il est évident que dans les avortements mycoplasmiques (tardifs) cette présence est effective mais rien ne permet de se prononcer sur la présence de germes dans les tous premiers stades de la gestation.

Enfin, il reste à étudier la contamination possible du tractus génital femelle femelle par le sperme lors de la monte naturelle ou de l'IA.

ANNEXE : 1

MILIEU SELECTIF BRUCELLA OVIS

(L. Jones Ann. Rech.
Vet. 1975, 6, (1).

GC MEDIUM BASE 36 g

ou

BRUCELLA MEDIUM 45 g

- . Dissoudre dans eau distillée 1 000 ml
- . Chauffer jusqu'à ébullition
- . Répartir en flacons de 100 ml
- . Stériliser à l'autoclave

- . Refroidir à 50°C
- . Ajouter 7 ml de sang de mouton stérile (7%)
 - 1 ml de mélange inhibiteur VCN par flacon
 - 0,5 ml de Furadantine (sol. 2mg/ml) de 100 ml

Mélanger n

- . couler en boîtes de Pétri 20 ml/boîte

Annexe 2 : Milieu au Tryptose pour mycoplasmes

Produits	Quantités
Tryptose Difco	20 g
Glucose	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique (anhydre)	2.5 g
Extrait de levure Difco	6 g
Eau distillée	900 ml
	(pour 1 l.q.s.)

- Ajouter 10% de sérum de cheval et ajuster le pH
- La glycérine est apportée aux milieux de production

Annexe 2 : Milieu pour le test de l'hydrolyse du glucose

Produit	Quantités
Heart Infusion Broth Difco	180 ml
Sérum de cheval	40 ml
Extrait frais de levure à 25%	20 ml
* A.D.N. (solution à 0.2%)	2.6 ml
Glucose (solution à 50%)	2 ml ou 1g
Rouge de phénol (I.P.)	5 ml

pH= 7.8; milieu stérilisé par filtration

*: facultatif dans la conception du milieu

Table de Taylor (1962)

Extrait de "Theory and practice in experimental bacteriology"
1965, p. 204

Tables 6.10-6.12. *The most probable number (M.P.N.) of organisms in viable counts by the dilution method*

Each of these tables has been computed for a dilution factor of 10, and for either 5, 8, or 10 tubes inoculated from each dilution of culture (Tables 6.10, 6.11, 6.12 respectively).

The entries in each table are the numbers of turbid tubes observed after inoculation of the same volume from any three successive 10-fold dilutions. The stated M.P.N. is the estimated mean viable count per inoculum taken from the most concentrated suspension.

Example 1. Suppose 1 ml. was inoculated from the 10^0 , 10^{-1} and 10^{-2} dilutions of culture into 5 tubes for each dilution, and that the numbers of turbid tubes observed after incubation were 4-2-1. Table 6.10 shows that the M.P.N. = 2.6 per inoculum taken from the 10^0 dilution.

Example 2. Suppose the same results were obtained with tubes inoculated from 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} dilutions. The M.P.N. is then 2.6 per inoculum taken from the 10^{-2} dilution, or 2.6×10^2 per inoculum of undiluted culture.

The tables include only those combinations of results likely to be compatible with equation 6.3: the probability that a given result would be obtained from the stated M.P.N. is provided in the original papers.

The published form of these tables differs slightly from that used here as they were originally computed for a different form of the dilution count. Instead of making serial dilutions of culture and taking the same volume from each dilution for inoculation, as described here, the culture was not diluted but different volumes of inoculum were taken from it, for example 10, 1, and 0.1 ml., the resulting differences in the concentration of culture medium being ignored. The published tables therefore give the M.P.N./ml. or per 100 ml. culture.

Table 6.10. *Values of the M.P.N. for 5 tubes inoculated from each of three successive 10-fold dilutions (Taylor, 1962)*

Numbers of turbid tubes observed at three successive dilutions			M.P.N. (per inoculum of the first dilution)	Numbers of turbid tubes observed at three successive dilutions			M.P.N. (per inoculum of the first dilution)
0	1	0	0.18	5	0	0	2.3
1	0	0	0.20	5	0	1	3.1
1	1	0	0.40	5	1	0	3.3
2	0	0	0.45	5	1	1	4.6
2	0	1	0.68	5	2	0	4.9
2	1	0	0.68	5	2	1	7.0
2	2	0	0.93	5	2	2	9.5
3	0	0	0.78	5	3	0	7.9
3	0	1	1.1	5	3	1	11.0
3	1	0	1.1	5	3	2	14.0
3	2	0	1.4	5	4	0	13.0
4	0	0	1.3	5	4	1	17.0
4	0	1	1.7	5	4	2	22.0
4	1	0	1.7	5	4	3	28.0
4	1	1	2.1	5	5	0	24.0
4	2	0	2.2	5	5	1	35.0
4	2	1	2.6	5	5	2	54.0
4	3	0	2.7	5	5	3	92.0
				5	5	4	160.0

BIBLIOGRAPHIE

1. WOLFE D.F., STRINFELLOW D.A., RIDDEL M.G., LAUERMAN L.H., and GALIK P.K. (1988). Adherence of Brucella ovis to preimplantation ovine ova. Theriogenology 30, 387-393.
2. RIDDEL M.G., STRINFELLOW D.A., WOLFE D.F., and GALIK P.K. Sero conversion of recipient ewes after transfer of embryos exposed to Brucella ovis in vitro. Theriogenology 1989, 31 : 248
3. BRITTON A.P., ROHNKE H.L., MILLER R.B., JOHNSON W.H., LESLIE K.E., ROSENDAL S. In vitro exposure of Bovine morulae to Ureaplasma diversum. Can.J.Vet.Res. 1987, 51: 198-203
4. MALLEK Z., GUERIN B., NIBART M., PAREZ M. et THIBIER M.(1984). Conséquence de la contamination in vitro des embryos de souris et de vache par Brucella abortus. Bull Acad. Vet. de France, 57,479-490.
5. SINGH, E.L., THOMAS, F.C., PAPP-VIC, G.EAGLESOME, M.D. and HARE, W.C.D. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. II. The in vitro exposure of preimplantation bovine embryos to infectious bovine rhinotracheitis virus. Theriogenology : 18 : 133-140 (1982).
6. MEINERSHAGEN,W.A., FRANK, F.W. and WALDHALM, D.G. Brucella ovis as a cause of abortion in ewes. Am.J.Vet.Res. 35:723-724.
7. LIBAL , M.C. and KIRKBRIDE, L.A. (1983). Brucella ovis induced abortion in ewes. J. Am. Vet. Med. Assoc. 183: 553-554 .
8. PERREAU P. Les mycoplasmoses de la chèvre. Cah. Med. Vet., (1979).
48 : 71-85.
9. LEFEVRE P.C., JONES G.E. et OJO M.O. (1987). Les mycoplasmoses

pulmonaires des petits ruminants. Rev. Sci. Tech. Off
Int. Epiz., 713-757.

10. THIBIER M. Le transfert embryonnaire chez les animaux de ferme. In 13ème Conférence de la Commission régionale de l'OIE pour l'Europe (MADRID). (1988) 3-39.
11. WINTENBERGER-TORRES S., SEVELLEC C., Atlas du développement embryonnaire précoce chez les ovins. INRA.
12. SINHG E.L., HARE W.C.D., THOMAS F.C., EAGLESOME M.D. and BIELANSKI A., Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IV Non-transmission of infectious bovine rhinotracheitis (infections pustular vulvovaginitis virus following trypsin treatment of exposed embryos. Theriogenology 1983, 20: 169-176.