

*Bull. Acad. Vét. de France, 1988, 61, 513-520*

## **Absence de contamination microbiologique des embryons bovins fécondés in vitro**

par B. GUÉRIN, B. LE GUIENNE et M. THIBIER \*

### **RÉSUMÉ**

Le but de cette étude était de connaître la nature et l'ampleur de la contamination éventuelle des embryons bovins fécondés in vitro à partir d'ovocytes prélevés à l'abattoir. Vingt-neuf vaches d'origine et d'âge non déterminés, à un stade quelconque de leur cycle sexuel ont été l'objet des prélèvements suivants : sang veineux périphérique (10 ml), ovocytes immatures, liquides folliculaires et cellules d'oviducte, à des fins de recherches sérologiques (Brucellose, Leucose bovine enzootique, IBR/IPV, BVD/MD) bactériennes ou virales (BHV 1 ; BVD/MD V). Parmi les 29 vaches, une a présenté une réaction sérologique positive vis-à-vis de la Brucellose, 2 une réaction positive vis-à-vis de la Leucose, 5 une réaction positive vis-à-vis de l'IBR/IPV et 21 une réaction positive vis-à-vis de la BVD/MD. Aucun animal n'a été trouvé virémique à la recherche du virus BVD/MD. Aucun agent bactériologique ou viral n'a été retrouvé sur les prélèvements du tractus génital, sur les œufs non segmentés ou sur les embryons.

Ces observations sont compatibles avec l'absence de risques sanitaires que pourrait présenter la remise en place sur des receveuses, d'embryons fécondés in vitro issus d'ovocytes prélevés en abattoir.

*Mots clés* : Bovins - Fécondation in vitro - Agents pathogènes.

### **SUMMARY**

#### **LACK OF MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION FROM BOVINE IN VITRO FERTILIZED EMBRYOS**

The aim of the present survey was to study the possible microbiological contamination of in vitro fertilized ova/embryos from oocytes collected at the abattoir.

A total of 29 cows were submitted to various samplings. They were of undetermined origine, age and at any stage of their reproductive cycle. Sampling included blood from peripheral veins (10 ml), immature oocytes, follicular fluids, oviductal cells for serological (Brucellosis, Leucosis, IBR/

---

\* Laboratoire pour le Contrôle des Reproducteurs — U.N.C.E.I.A. — 13, rue Jouët, B.P. 65, 94703 Maisons-Alfort (France).

IPV, BVD/MD) or bacteriological or viral analysis (BHV 1; BVD/MD V). Non cleaved ova (n=78) or embryos (n=66) up to a maximal blastocyst stage, were obtained by total in vitro procedure. Among the 29 cows, some were serologically positive as follows: Brucellosis, 1; Leucosis, 2; IBR/IPV, 5; BVD/MD, 21. None were BVD/MD virus positive from blood samples. No bacterial nor viral contamination was found from uncleaved ova or from IVF embryos.

The present observations are consistent with the possible lack of risks of contamination from IVF embryos originating from oocytes collected at the abattoir.

## INTRODUCTION

Les progrès très récents obtenus en fécondation in vitro chez les bovins (LE GUIENNE et THIBIER, 1988 ; LE GUIENNE et al., 1988 ; LU et al., 1988) rendent désormais possible le recours à ce mode de reproduction en complément de l'Insémination Artificielle (I.A.) et du Transfert Embryonnaire (T.E.). Depuis les débuts de l'I.A., il y a plus de 40 ans, puis de ceux du T.E. appliqué sur le terrain depuis une dizaine d'années, la communauté scientifique vétérinaire s'est efforcée de déterminer puis de contrôler les risques sanitaires éventuellement associés à ces techniques (voir revue de THIBIER, 1988).

De nombreux agents pathogènes peuvent en effet être présents dans le tractus génital mâle ou femelle et quelques-uns d'entre eux entraîner une contamination de la femelle inséminée ou receveuse d'embryons (voir revue de HARE, 1985). Les mesures prophylactiques sont désormais bien connues et largement appliquées rendant ainsi sans danger sanitaire, le recours à ces techniques (SINGH, 1988).

En raison de la réussite récente de la fécondation in vitro et de la culture de ces embryons jusqu'à un stade morula ou blastocyste, susceptible d'entraîner le transfert de tels embryons sur des femelles receveuses (EYESTONE et FIRST, 1988 ; FUKUI et ONO, 1988 ; LE GUIENNE et THIBIER, 1988), il devient désormais nécessaire d'évaluer les risques de transmission d'agents pathogènes par une telle méthode. Ceci n'a pas encore été déterminé à notre connaissance. C'est pourtant d'autant plus indispensable que la technique actuelle est caractérisée par la collecte d'ovocytes à partir d'ovaires prélevés à l'abattoir sur des vaches tout-venant.

Le but de la présente étude a donc été de rechercher la présence éventuelle d'agents bactériens ou viraux associés aux embryons fécondés in vitro. Afin d'apprécier l'environnement microbiologique intrinsèque de l'animal en plus de la contamination extrinsèque éventuelle, les animaux abattus à partir desquels les fécondations ont été réalisées, ont été l'objet de prélèvements sanguins et génitaux destinés à l'analyse sérologique, bactériologique ou virale.

## MATERIEL ET METHODES

## 1. Animaux

Un ensemble de 29 vaches a été l'objet de ces prélèvements. Elles étaient d'origine inconnue, d'âge indéterminé et de races diverses. Certaines avaient été l'objet d'abattage obligatoire dans le cadre de la prophylaxie sanitaire des maladies contagieuses. Elles étaient à un stade quelconque de leur cycle sexuel ou en anoestrus ; les animaux gestants avaient été exclus.

## 2. Prélèvements

A l'abattoir, au moment de la saignée, 10 ml de sang veineux périphérique ont été collectés dans des tubes vacuaires SST (BECTON DICKINSON) puis conservés à la température de 25 °C environ jusqu'au laboratoire. Les ovaires et les oviductes ont été également prélevés *post-mortem* et placés immédiatement à la température de 35 °C et de 2 °C respectivement jusqu'à leur traitement au laboratoire.

A l'arrivée et aux fins d'analyses bactériologiques et virales, les follicules de 1 à 5 mm de diamètre ont été ponctionnés. Les ovocytes (n = 99) et les liquides folliculaires (n = 29) ont été séparés. Simultanément, des échantillons de cellules tubaires (n = 29) sont également soumis à analyse.

3. Maturation et fécondation *in vitro*

Au laboratoire, les ovocytes sont prélevés par ponction dans les follicules de 1 à 5 mm de diamètre. Ils sont séparés du liquide folliculaire et lavés trois fois dans 3 ml de milieu 199 (Gibco) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SFV).

Ils sont ensuite cultivés 26 heures dans du milieu B 2 (INRA Menezo, API system) additionné de 10 % de SFV et contenant 10 mcg/ml de FSH et 1 mcg/ml d'œstradiol, en présence de 5 millions de cellules de granulosa par millilitre. Le sperme est décongelé puis les spermatozoïdes les plus mobiles sont sélectionnés par migration ascendante dans du milieu de Tyrode contenant de l'albumine, du lactate et du pyruvate (TALP) (PARISCH et al., 1988) puis centrifugés à 200 g pendant 10 min.

Après maturation, les ovocytes sont rincés trois fois dans le TALP avant d'être mis en incubation avec un million de spermatozoïdes par millilitre en présence d'hypotaurine, de pénicillamine et d'épinéphrine ainsi que de 0,1 mcg/ml d'héparine. Après 18 heures de contact avec les spermatozoïdes, les zygotes sont cultivés pendant 5 à 7 jours sur un tapis de cellules d'oviducte établi par culture dans du milieu B 2 additionné de 10 % de SFV.

Ainsi, 144 ovocytes ont été l'objet de tentatives de fécondation *in vitro*.

#### 4. Examens sérologiques et virologiques issus des prélèvements sanguins

Les techniques utilisées sont celles communément en usage dans notre laboratoire selon les procédures agréées par le Ministère de l'Agriculture de la République française. Les examens sérologiques se sont rapportés à la Brucellose (séro-agglutination lente dite de WRIGHT, fixation du complément) à la Leucose bovine enzootique (immunodiffusion sur gélose - IDG), à l'IBR/IPV (séro-neutralisation sur cellules de rein de veau fœtal) (GOFFAUX et al., 1973) et à la BVD/MD (séro-neutralisation sur lignée cellulaire Bovine Turbinate BT).

Sur ces mêmes échantillons, a été recherchée la présence éventuelle du virus BVD/MD sur la même lignée cellulaire (MEYLING, 1984).

#### 5. Examens bactériologiques et virologiques issus des prélèvements du tractus génital et des embryons

5.1. Les liquides folliculaires sont inoculés sur cellules de rein de fœtus de veau et sur cellules BT en vue des recherches des virus BHV 1 et BVD/MD respectivement et sur gélose Columbia (Difco Lab.) additionnée de 5 % de sang de mouton ainsi que sur le milieu Brain Heart Infusion Broth (Difco Lab.) en vue des recherches bactériologiques.

5.2. Les ovocytes et embryons, après lavage ( $n = 10$ ) sont broyés dans du tampon phosphate 0,01 M ( $\text{pH} = 7,2$ ). Les broyats obtenus sont traités comme précédemment.

5.3. Les oviductes sont perfusés avec 1 ml de MEM. Les suspensions cellulaires obtenues sont soumises à des recherches de virus BHV 1 et BVD/MD sur les systèmes cellulaires cités plus haut ainsi qu'à des recherches bactériologiques.

## RESULTATS

Les analyses sérologiques et virologiques effectuées sur les prélèvements sanguins permettent de caractériser la situation sanitaire des animaux objets de cette étude. Les résultats sont indiqués au tab. I. Ils montrent que la majorité des femelles n'avait pas été au contact des principaux agents pathogènes recherchés ici, à l'exception du virus BVD/MD. Aucune cependant n'était en phase virémique.

Parmi les ovocytes soumis à la fécondation *in vitro*, 66 d'entre eux (45 %) ont été l'objet d'au moins une division cellulaire indiquant la réalité d'une fécondation. Ceux-ci se sont répartis selon le stade atteint de leur développement sur tapis cellulaire tubaire de la façon suivante : moins de 8 cellules,  $n = 38$  ; 8 cellules,  $n = 20$  ; morula,  $n = 7$  ; blastocyste,  $n = 1$ .

Les résultats d'examens bactériologiques et virologiques issus de ces 301 échantillons sont indiqués au tab. II. Aucun élément bactérien

TABLEAU I  
 Résultats des tests sérologiques et virologiques  
 obtenus à partir des prélèvements sanguins

	Brucellose	Leucose	IBR/IPV	BVD/MD	
				sérologie	antigène
Vaches +	1	2	5	21	0
Vaches —	28	27	24	8	29
Total	29	29	29	29	29

TABLEAU II  
 Résultats des examens bactériologiques et virologiques  
 obtenus à partir des prélèvements du tractus génital  
 et d'embryons fécondés in vitro

Echantillons	Nombre	Bactériologie	Virologie	
			BHV 1	BVD/MD V
Ovocytes immatures	99	Négatif	Négatif	Négatif
Liquides folliculaires	29	Négatif	Négatif	Négatif
Cellules tubaires	29	Négatif	Négatif	Négatif
Œufs non segmentés	78	Négatif	Négatif	Négatif
Embryons	66	Négatif	Négatif	Négatif

Prélèvements issus de 29 vaches.

n'a été mis en évidence à partir des prélèvements étudiés. Semblablement, aucun élément viral, BHV 1 ou BVD/MD n'a été détecté sur les cellules utilisées pour leur mise en évidence.

## DISCUSSION

Les caractéristiques sérologiques et virologiques obtenues après analyse des sérums ne mettent pas en évidence un état sanitaire désas-

treux des animaux étudiés. Les données observées ici pourraient cependant être représentatives du niveau sanitaire de la population femelle nationale à partir de laquelle les ovocytes sont prélevés lors des opérations de fécondation in vitro. A ce titre, la présente étude reflète bien les conditions usuelles de cette pratique. Les vaches n'étaient donc pas soumises à un environnement pathologique intrinsèque défavorable susceptible d'entraîner une contamination importante des gonades ou du tractus génital extra-gonadique.

On peut cependant remarquer qu'une femelle était sérologiquement positive vis-à-vis de la Brucellose et à ce titre pouvait héberger quelques bactéries ; 2 étaient positives vis-à-vis de la Leucose et 5 positives vis-à-vis de l'IBR/IPV. Les particularités pathogéniques propres à cette herpès-virose permettent d'affirmer la présence de ce virus au sein de l'animal. Enfin 21 vaches avaient été préalablement en contact avec le virus BVD/MD.

Le taux de développement des embryons observés ici est légèrement inférieur à ce que l'on a obtenu en moyenne sur plusieurs milliers d'ovocytes que l'on tente de féconder in vitro. Il est cependant proche de ceux obtenus antérieurement dans notre laboratoire dans des conditions expérimentales identiques (LE GUIENNE et al., 1988) ou dans d'autres instituts (LU et al., 1988). La nature de cette étude et les animaux dont sont issus les prélèvements n'ont en tout état de cause pas modifié significativement la réussite de ces opérations.

Enfin, les résultats des examens bactériologiques et virologiques effectués sur les cellules ou les tissus génitaux sont particulièrement univoques. Aucune contamination « initiale », avant les tentatives de fécondation in vitro, n'a été observée. Ceci indique tout d'abord qu'il n'y avait vraisemblablement aucune phase aiguë d'épisode clinique et donc que les risques de contamination étaient au départ proches de la nullité. Il est néanmoins important de souligner la faible probabilité de collecter des ovocytes contaminés sur un tel échantillonnage d'individus représentatif de la population. Ceci démontre aussi que la qualité de la manipulation en abattoir, puis le retour au laboratoire sont satisfaisants et n'apportent aucun contage extérieur.

Quant aux résultats « finaux » sur embryons non segmentés ou fécondés, la stérilité parfaite au plan bactériologique et pour les virus envisagés a été la règle absolue. Ceci est d'ailleurs cohérent avec les conditions d'asepsie dans lesquelles ces opérations sont nécessairement effectuées. Toute contamination bactérienne et fongique en particulier, d'une part s'observe facilement au microscope et d'autre part compromet le plus souvent totalement la poursuite des opérations (LE GUIENNE, observation personnelle). On peut souligner en outre que tous les milieux utilisés sont stériles et que les embryons font l'objet systématiquement de 8 bains différents constituant à chaque fois un facteur de dilution important ( $1/30^{\circ}$ ) de l'environnement immédiat de l'embryon.

Des travaux en cours s'efforceront d'envisager le devenir d'agents susceptibles de s'absorber sur la membrane pellucide d'embryons fécondés in vivo tels que le BHV 1 (SINGH et al., 1982, 1983) sur des embryons fécondés in vitro.

En conclusion, cette première étude de ce type a montré que les risques de contamination de receveuses d'embryons fécondés in vitro issus d'ovocytes collectés à partir de ces femelles tout-venant à l'abattoir semblaient des plus minimes. Ceci permet donc d'envisager sous un angle favorable le recours ultérieur à la fécondation in vitro comme mode de reproduction. Des études complémentaires doivent s'efforcer d'envisager la nature de tels risques lorsque les femelles donneuses d'ovocytes sont en phase aiguë d'épisodes cliniques de maladies susceptibles d'être transmises par voie génitale.

#### BIBLIOGRAPHIE

- EYESTONE (W.H.) et FIRST (N.L.) (1988). — Co-culture of bovine embryos with oviductal tissue. In 11th Intern. Congr. anim. Reprod. and A.I. (Dublin, 1988), 4, Short com, n° 471.
- FUKUI (Y.) et ONO (H.) (1988). — In vitro development to blastocysts of in vitro matured and fertilized bovine oocytes. *Vet. Rec.* 122, 282.
- GOFFAUX (M.), HARLAY (Th.) et PAREZ (M.) (1973). — Enquête sur la présence dans le sérum de taureaux d'I.A., d'anticorps neutralisant le virus IBR. IPV. *Élevage et Insémination*, 136, 38-46.
- HARE (W.C.D.) (1985). — Maladies transmissibles par la semence et les techniques de transfert embryonnaire. O.I.E. Série technique n° 4, 119 p., O.I.E. (Paris).
- LE GUIENNE (B.) et THIBIER (M.) (1988). — Premiers blastocystes bovins obtenus en totalité in vitro. *Élevage et Insémination*, 224, 11-14.
- LE GUIENNE (B.), THIBAUT (C.), CHUPIN (D.), GÉRARD (M.) et THIBIER (M.) (1988). — Fécondation in vitro chez les mammifères domestiques. *Élevage et Insémination*, 225, 13-22.
- LU (K.M.), GORDON (I.), GALLAGHER (M.), Mc GOVERN (J.) (1988). — Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.* 121, 259-260.
- MEYLING (A.) (1984). — Detection of BVD virus in viremic cattle by an indirect immunoperoxidase technique. *Curr. Top. Med. Anim. Sci.*, 29, 37-46.
- PARRISH (J.J.), SUSKO-PARRISH (J.L.), LIEBFRIED-RUTLEDGE (M.L.), CRISTSER (E.S.), EYESTONE (W.H.), FIRST (N.L.) (1986). — Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology*, 25, 591-600.
- SINGH (E.L.), THOMAS (F.C.), EAGLESOME (M.D.), PAPA-VID (G.) et HARE (W.C.D.) (1982). — 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.

- SINGH (E.L.), HARE (W.C.D.), THOMAS (F.C.) et BIELANSKI (A.) (1983). — Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IV. Non transmission of IBR. IPV. virus from donors shedding virus. *Theriogenology*, 20, 169-176.
- SINGH (E.L.) (1988). — Determining the disease transmission potential of embryos and semen. In 3<sup>e</sup> Congrès mondial de Reproduction et Sélection des ovins et bovins à viande. Paris, vol. 1, 659-672. Inra Public. (Paris).
- THIBIER (M.) (1988). — Insémination artificielle et transfert embryonnaire : contrôle sanitaire des reproducteurs. *Bull. Elevage Français. Suppl.* 22, 2-17.
-