

Bull Acad. Vét. de France, 1984, 57, 479-490

Conséquences de la contamination *in vitro* des embryons de souris et de vaches par *Brucella abortus*

par Z. MALLEK (1), B. GUÉRIN (2), M. NIBART (3),
M. PAREZ (3) et M. THIBIER (2) (3)
présenté par M. THIBIER

RÉSUMÉ

On a cultivé *in vitro* des embryons de souris et de vache, à zone pellucide intacte, dans des milieux contenant 10^1 à 10^5 brucella par ml pour tester la viabilité et les risques de contamination de ces embryons après contact prolongé de 24 h et 48 h.

Il en ressort que :

— pour de faibles concentrations en brucella (10^1 à 10^2 b/ml), la viabilité des embryons est peu modifiée par rapport aux témoins ;

— dans nos conditions expérimentales, aucun embryon n'a été contaminé après 48 heures de contact quelle que soit la concentration en brucella et en particulier celles-ci ne sont pas adsorbées sur la zone pellucide ;

— dix lavages successifs des embryons contaminés, même à des concentrations élevées sont suffisants pour éliminer les brucella du milieu de transfert (effet dilution) à condition de respecter le protocole proposé.

En conclusion, il paraît possible d'utiliser des vaches brucelliques de haute valeur génétique comme donneuses d'embryons, sans risque de transmission de cette maladie aux receveuses et aux futurs produits.

Mots clés : Transfert embryonnaire - Bovins - Brucellose.

SUMMARY

EFFECTS OF IN VITRO CONTAMINATION BY BRUCELLA ABORTUS ON MICE AND COWS EMBRYOS

In vitro cultures of mice (as a model) and cows embryos with intact zona pellucida have been performed in media containing 10^1 to 10^5 brucella per ml. This was aimed at evaluating both viability and risks of contami-

- (1) Boursier du Gouvernement français. Présente adresse : Ecole Nationale Vétérinaire, 2020 Sidi Thabet (Tunisie).
- (2) Laboratoire pour le Contrôle des Reproducteurs, 13, rue Jouët, 94700 Maisons-Alfort.
- (3) Services Techniques de l'U.N.C.E.I.A. (Union Nationale des Coopératives d'Élevage et d'Insémination Artificielle), 13, rue Jouët, 94700 Maisons-Alfort.

nation of these embryos after 24 or 48 h of such cultures. It was found: (1) with low concentrations of brucella (10^1 - 10^2 b./ml, embryo viability was not affected when compared to that of controls; (2) in our experimental conditions, no embryo was found to be contaminated after 48 h whatever was the brucella concentration in the culture medium; in particular, brucella were not adsorbed on the zona pellucida; (3) ten consecutive washings of the embryos initially inserted in a brucella-infected medium (at any of the concentrations studied) are definitely sufficient to eliminate all brucella from the transfer medium under strict conditions defined in the present paper.

In conclusion, embryos from cows with high breeding values but unfortunately affected with brucellosis may be transferred with no risk of contamination neither to the embryo nor to the recipient.

Key words : Embryo transfer - Bovine - Brucellosis.

INTRODUCTION

Après un part normal ou pathologique, la durée de la sécrétion bactérienne par des vaches brucelliques varie de quelques jours à quelques semaines selon les auteurs : SCHROEDER et COTTON (1916), FITCH *et al.* (1930, 1939), BIRCH et GILMAN (1931). Pour certains animaux, cette excrétion peut même se poursuivre plusieurs mois après le part. KERR *et al.* (1958), PHILIPPON *et al.* (1970 b), STRINGFELLOW *et al.* (1982, 1983) ont étudié la possibilité d'utilisation de vaches brucelliques comme donneuses d'embryons dans le cadre d'opération de transfert. Ils ont montré que les brucella ne persistent pas longtemps dans l'utérus et qu'elles se réfugient dans d'autres gîtes telle que la mamelle. Cependant, chez les vaches sûrement infectées, *Brucella abortus* a été retrouvée dans les ganglions rétro-mammaires (89 %), les ganglions iliaques (83 %), la rate (76 %), la mamelle (60 %) et l'utérus (51 %), six semaines après le part et trois à cinq mois et demi après l'épreuve infectante (PHILIPPON *et al.*, 1970 a).

Le risque sanitaire qui s'attache aux opérations de transfert d'embryons peut se situer au niveau de la contamination des liquides de collecte et/ou de transfert, ou directement au niveau de l'embryon. L'hypothèse d'une contamination directe de l'embryon a déjà fait l'objet de plusieurs travaux. Ainsi SINGH *et al.* (1982) ont signalé que les virus sont probablement les seuls micro-organismes pathogènes susceptibles d'être à l'origine d'une transmission éventuelle de maladies par l'intermédiaire d'un embryon à zone pellucide intacte.

Toutefois les recherches concernant l'action éventuelle sur les embryons de certaines bactéries hautement pathogènes, sont encore très limitées.

On peut ainsi envisager qu'un embryon, récolté sur une vache brucellique, soit lui-même contaminé et constitue de ce fait un vecteur de dissémination de la maladie, que cette contamination soit superficielle si elle se situe au niveau de la zone pellucide où serait

adsorbé l'agent infectieux, ou interne si l'agent pathogène a pénétré l'embryon lui-même.

VOELKEL *et al.* (1983) ont inoculé des vaches superovulées, 48 h après les chaleurs, par voie utérine avec 0,5 ml d'une suspension contenant 10^4 et 10^8 brucella. Aucune brucella n'a été isolée des liquides de lavage utérin 5 jours après inoculation.

Ces travaux quelque peu différents par leurs résultats, tendent à montrer que, pour certaines vaches brucelliques, la contamination de l'utérus peut persister jusqu'à 60-90 jours après l'avortement ou le vêlage. Or, c'est généralement au-delà de 60 jours post-partum que se situe la première récolte d'embryons de donneuses indemnes.

Le but de ce travail est donc d'étudier, au moyen d'embryons à zone pellucide intacte, contaminés *in vitro* par des brucella virulentes, la possibilité d'utilisation des vaches brucelliques de haute valeur génétique comme donneuses d'embryons et de contribuer ainsi à préciser les risques éventuels pour la receveuse et/ou le futur produit, liés à la transplantation d'embryons récoltés sur des vaches infectées de brucellose.

MATERIEL ET METHODES

1. RÉCOLTE DES EMBRYONS

1.1. *Embryons de souris*

Afin de tester les conditions de contamination *in vitro*, ont été utilisées comme modèle, des souris « Swiss », âgées de 6 à 8 semaines superovulées et saillies selon la méthode décrite par BRINSTER (1965). Trois jours après la saillie, les souris sont sacrifiées. Les oviductes et les cornes utérines sont perfusées avec le milieu de culture standard (sans antibiotique) pour embryon de souris, cité par BIGGERS *et al.* (1971). Au total 432 embryons à zone pellucide intacte au stade morula (J_3) ont été récupérés et utilisés dans ce travail.

1.2. *Embryons de vaches*

Douze vaches, indemnes de brucellose, superovulées (FSH-P, BURNS-BIOTEC) ont été inséminées 12 et 24 heures après le début des chaleurs avec de la semence congelée provenant de taureaux indemnes de brucellose. La collecte des embryons a été faite à J 5-J 6 (J_0 = jour des chaleurs) selon la méthode cervicale décrite par NIBART et BOUYSSOU (1981), avec une solution tampon phosphate modifiée selon WHITTINGHAM (1971). Au total 48 embryons à zone pellucide intacte ont été jugés comme des morulas selon leur aspect morphologique.

2. CULTURE DES BRUCELLA

Les suspensions de brucella ont été obtenues à partir de la souche de *Brucella abortus* 544. Cette souche conservée dans l'azote liquide a été repiquée au moment de son utilisation sur milieu TSA (Tryptic Soy Agar, DIFCO) enrichi de 5 % de sérum de veau stérile, exempt d'anticorps anti-brucella. Les cultures ont été obtenues après incubation des milieux dans une atmosphère contenant 10 % CO₂. La suspension-mère de brucella titrant 1×10^7 brucella/ml a été préparée dans une solution tampon phosphate sans antibiotique et la concentration en micro-organismes a été déterminée par la méthode turbidimétrique décrite par ALTON et JONES (1968). Le développement des brucella a été vérifié dans les milieux de culture utilisés pour les embryons de souris et de vache par dénombrement après 0 h, 8 h, 24 h et 48 h d'incubation à 37° C.

3. EPREUVE DE CONTAMINATION DES EMBRYONS EN CULTURE

La culture des embryons a été réalisée en tube de verre de 5 ml (bouchons à vis) en étuve à 37° C. Les embryons de chaque lot ont été traités simultanément. Toutes les manipulations ont été faites stérilement sous hotte à flux laminaire à température du laboratoire (20° C). Les 432 morulas de souris ont été partagées en 6 lots différents : 5 lots de 65 morulas contaminées par des concentrations de brucella de $1,6 \times 10^1$ à $1,6 \times 10^5$ bactéries/ml et un lot de 107 morulas témoins non contaminées. Les embryons de souris ont été cultivés dans le milieu décrit par BIGGERS *et al.* (1971) sans antibiotique. L'incubation a été réalisée à 37° C sous atmosphère d'un mélange gazeux composé de 90 % N₂, 5 % CO₂ et 5 % O₂. Les 48 morulas de vaches ont été divisées en 4 lots : 3 lots de 13, 12 et 5 embryons contaminés respectivement par $1,6 \times 10^2$, $1,6 \times 10^4$ et $1,6 \times 10^5$ brucella par ml et un lot témoin non contaminé de 18 morulas. Les embryons de vache ont été cultivés dans le tampon phosphate modifié, sans antibiotique, enrichi avec 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté et exempt d'anticorps anti-brucella. La contamination expérimentale des embryons a été réalisée en ajoutant aux 3 ml de liquide de culture des embryons, 50 µl d'une suspension-mère de *Brucella abortus* souche 544 convenablement diluée en tampon phosphate pH 7,2, afin d'obtenir les concentrations désirées. Après 24 heures d'incubation à 37° C, les embryons sont examinés et remis en incubation 24 heures dans un milieu neuf contaminé de la même façon que le milieu initial. Cette opération a pour but de maintenir aussi constante que possible la concentration bactérienne mise au contact des embryons.

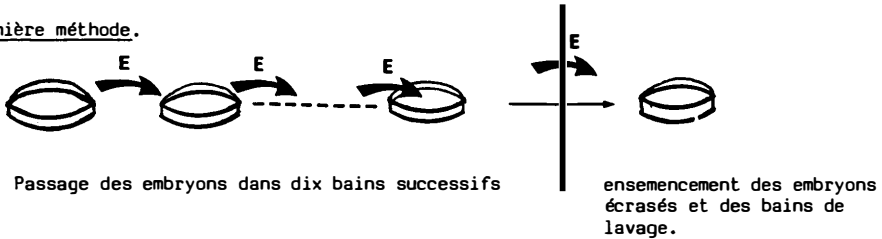
4. LAVAGE ET ENSEMENCEMENT DES EMBRYONS

Nous avons eu recours à deux méthodes distinctes de lavage et d'ensemencement des embryons :

4.1. Première méthode

Cette méthode, appliquée à 138 embryons de souris et 16 embryons de vache (fig. 1), consiste à passer, séparément, les embryons dans dix bains successifs de tampon phosphate sans antibiotique en

Première méthode.



Deuxième méthode.

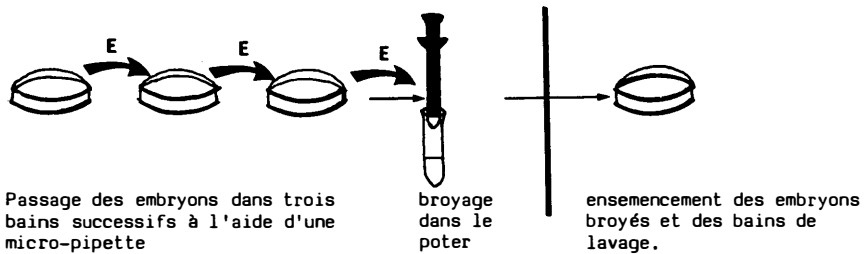


FIGURE 1

Lavage et ensemencement des embryons contaminés (E)

changeant de pipette entre chaque bain. Les embryons restent environ cinq minutes dans chaque bain. Après le dixième bain, chaque embryon est déposé sur une boîte de Pétri (100 mm) contenant du milieu TSA (Tryptic Soy Agar) enrichi de 5 % de sérum de veau, où il est étalé par écrasement au moyen d'un rateau de verre très fin. L'opération est vérifiée à la loupe binoculaire ($G \times 64$). La présence de *Brucella abortus* dans les liquides de lavage successifs a été vérifiée par ensemencement sur 4 boîtes de Pétri contenant du milieu Tryptic Soy Agar enrichi. Pour les épreuves infectantes réalisées avec des concentrations de 10^5 bactéries/ml, tous les liquides de lavage ont été mis en culture. Pour les épreuves infectantes réalisées avec des concentrations inférieures à 10^5 bactéries/ml, seuls les trois derniers bains de lavage des embryons ont été ensemencés.

4.2. Deuxième méthode

Dans cette méthode, 197 embryons de souris et 14 de vaches ont été lavés dans 3 bains successifs de 4 ml de tampon phosphate sans

antibiotique. Au cours des opérations de lavage, les embryons ont été maintenus par dépression à l'extrémité d'une pipette de verre. Cette opération a eu pour but de réduire au minimum le milieu prélevé avec les embryons. Après les lavages, les embryons de souris d'une part, et de vaches d'autre part, ont été rassemblés en fonction de leur viabilité. Pour chaque concentration bactérienne étudiée, on a donc ainsi constitué 2 groupes d'embryons, les morts et les vivants, qui ont été broyés en poter type ELVEJHEM en présence d'eau et de sable de Fontainebleau stériles. Les broyats obtenus ont ensuite étéensemencés sur milieu Tryptic Soy Agar enrichi et incubés à 37° C pendant 4 à 10 jours. La présence de *Brucella abortus* dans les différents liquides de lavage a été vérifiée comme il a été indiqué précédemment pour la première méthode. La mise en évidence des colonies de brucella a été réalisée selon les méthodes classiques décrites par ALTON et JONES (1968).

5. ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique des résultats de l'effet des différentes concentrations de brucella sur la viabilité des embryons a été effectuée par le test de linéarité décrit par LELLOUCH et LAZARD (1974).

RESULTATS

1. CINÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT DES BRUCELLA DANS LES MILIEUX DE CULTURE POUR EMBRYONS

Ainsi que l'indique le tableau 2, les brucella se sont développées de façon satisfaisante dans chacun des 2 milieux de culture d'embryons. Ainsi, 24 heures après le début des cultures, la concentration de bactéries s'était accrue de plus de 2,5 fois dans le milieu de BIGGERS et de 7 fois dans le tampon phosphate.

TABLEAU 2
Cinétique de développement des brucella dans les milieux de culture pour embryons

	Temps d'incubation (heure)				
	0 h	8 h	24 h	32 h	48 h
Tampon phosphate + 10 % S.V.F.	n = 1,6 × 10 ²	1,3 n	7 n	22 n	—
Milieu de Biggers	n = 1,6 × 10 ²	1,1 n	2,5 n	6 n	11 n

n = Concentration initiale.

S.V.F. = Sérum de Veau Fœtal.

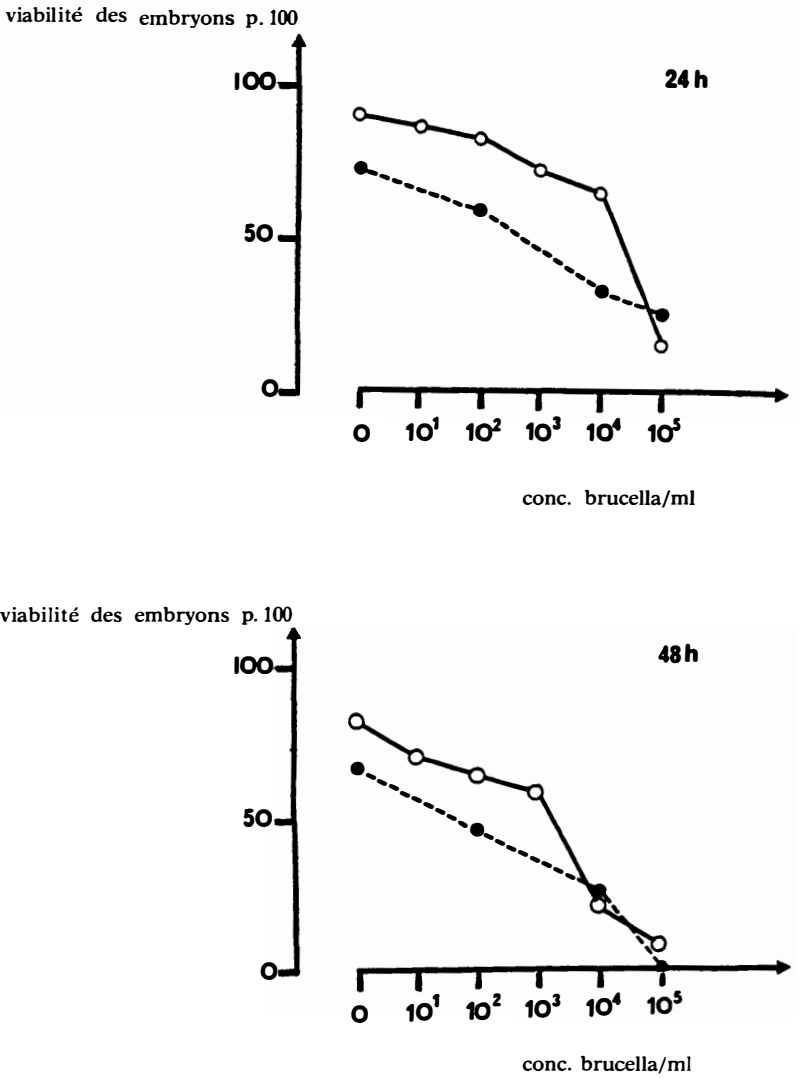


FIGURE 3

Effet de Brucella sur le développement des embryons après 24 et 48 h de contact

- — ○ Embryons de souris
 ● - - - ● Embryons de vaches

2. VIABILITÉ DES EMBRYONS DE SOURIS EN CONTACT AVEC LES BRUCELLA

Le taux de viabilité des embryons témoins est excellent et égal à 91 % et 82 % respectivement après 24 et 48 heures de culture. Les concentrations de 10^1 à 10^4 /ml de brucella altèrent modérément la survie des embryons après 24 heures. Cet effet est plus marqué après 48 h de culture (fig. 3). Ainsi à 10^4 brucella/ml de milieu, les taux de viabilité sont respectivement égaux à 65 et 21 %. Enfin la concentration de 10^5 exerce un effet drastique : seuls 15 et 7 % des embryons survivent respectivement après 24 et 48 heures. Il y a donc une relation significative ($p < 10^{-4}$) entre la concentration infectante et la viabilité des embryons mais cette relation n'est pas linéaire. L'effet le plus marqué s'exerce au delà de 10^4 brucella/ml de milieu ainsi que l'illustre la figure 3.

3. VIABILITÉ DES EMBRYONS DE VACHE EN CONTACT AVEC LES BRUCELLA

Bien que le nombre de zygotes soit moindre que pour l'espèce de laboratoire, l'allure des phénomènes est très proche de celle décrite pour la souris (fig. 3). Pour un pourcentage de survie de 72 et 66 % chez les témoins après 24 et 48 heures de culture, les taux de viabilité sont respectivement de 33 et 25 % pour une concentration de 10^1 brucella/ml et 20 et 0 % pour celle de 10^5 bactéries par ml.

4. RECHERCHE DES BRUCELLA DANS LES EMBRYONS

Aucune brucella n'a été isolée à partir des embryons lavés et ensemencés dans nos conditions expérimentales, quelle que soit la viabilité des embryons. Même les embryons dégénérés après 48 heures de contact avec les brucella ne semblent pas infectés après lavage. Ceci démontre que les brucella ne parviennent vraisemblablement ni à s'adsorber sur la zone pellucide ni à pénétrer dans l'embryon lui-même.

5. RECHERCHE DES BRUCELLA DANS LES LIQUIDES DE LAVAGE

Dans la première méthode de lavage et d'ensemencement pour la concentration de 10^5 bactéries/ml, la contamination bactérienne est faible à partir du huitième bain (1 seule colonie dans les 4 boîtes). Pour les neuvième et dixième baignades, les cultures sont stériles. Les sept premiers baignades sont contaminés de façon décroissante (tableau 4). Pour les concentrations bactériennes inférieures à 10^5 bactéries/ml, les cultures réalisées seulement pour les baignades 8, 9 et 10 sont demeurées stériles.

Dans la deuxième méthode de lavage et d'ensemencement, les liquides des premier et deuxième baignades contiennent des quantités décroissantes de brucella (non dénombrées) alors qu'aucune colonie de brucella n'a pu être isolée à partir des troisièmes baignades (tableau 5).

TABLEAU 4

Résultat des examens bactériologiques des liquides de lavage des embryons par la première méthode (a)

Bains Concentration en Brucella/ml	Bains									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
15 ⁵ (b)	++	++	++	++	++	++	++	+	—	—
10 ⁴ (b)	+	+	+	+				—	—	—
10 ³								—	—	—
10 ² (b)								—	—	—
10 ¹								—	—	—

(a) Voir texte.

(b) Pour les vaches : seules ces 3 concentrations de Brucella ont été testées.

TABLEAU 5

Résultat des examens bactériologiques des liquides de lavage des embryons par la deuxième méthode

Concentration en Brucella/ml	Bains		
	1	2	3
10 ⁵ (x)	++ +	++	—
10 ⁴ (x)	++	+	—
10 ³	++	+	—
10 ² (x)	+	+	—
10 ¹	+	+	—

Pour les souris : 5 concentrations de Brucella.

Pour les vaches : 3 concentrations de Brucella (x).

DISCUSSION

Dans les conditions physiologiques, l'embryon atteint l'utérus entre J4 et J5 (J0 = chaleurs) chez la vache. Il reste libre ensuite 2 à 3 jours avant l'opération de collecte de la donneuse. On peut penser que si l'utérus contient des brucella au moment de la collecte, la durée de contact embryon-brucella est de 48 h environ, si on admet qu'il n'y a pas de brucella dans l'oviducte. On a tenté de reproduire de telles conditions *in vitro* en maintenant en contact les embryons à zone pellucide intacte en culture pendant 48 h en présence d'une concentration constante de brucella. Notons en comparaison que la plupart des virologistes considèrent qu'un temps de contact *in vitro* de 1 heure entre virus et embryon est suffisant (HARE, communication personnelle, 1983). La quantité de brucella en contact avec les embryons varie de 10 à 100 000 par ml de milieu de culture. Avec cette dernière concentration, on se trouve nettement au delà du nombre de brucella qui pourraient se trouver dans l'utérus de vaches donneuses infectées naturellement et collectées plusieurs semaines après l'avortement ou le part, ALEXANDER *et al.* (1981), dénombant 10×10^{10} brucella par ml de liquide fœtal de vaches infectées naturellement.

Les faibles concentrations de brucella (10^1 à 10^2 /ml) ont peu de répercussion sur le développement des embryons. A l'inverse, les plus fortes concentrations altèrent leur développement. Il est possible que les produits qui résultent du métabolisme bactérien agissent soit directement sur l'embryon soit indirectement en modifiant la composition du milieu de culture. Ceci est peut-être à rapprocher de l'observation qu'en cas de métrite non brucellique, le pourcentage d'embryons viables est nettement diminué (ELSDEN *et al.*, 1979, NIBART *et al.*, 1982, MALLEK, 1984). Dans ces métrites, on retrouve des bactéries pathogènes et souvent *corynebacterium pyogenes* (MALLEK *et al.*, 1984, STEFFAN *et al.*, 1984) qui sont sans doute responsables, en partie au moins, de la chute de viabilité des embryons. Les deux méthodes d'ensemencement utilisées (écrasement des embryons et broyage en potter) permettent d'affirmer que dans nos conditions expérimentales et avec des embryons à zone pellucide intacte, l'embryon n'est pas contaminé et surtout les brucella ne sont pas adsorbées au niveau de la zone pellucide. Ceci méritait d'être prouvé car la surface de cette membrane est très anfractueuse (HARE, 1984) et certains virus comme celui de l'IBR-IPV (SINGH, 1984) peuvent s'y adsorber. Rien ne prouve que ce n'est pas le cas pour d'autres bactéries que Brucella.

Le lavage des embryons contaminés par Brucella même à doses élevées dans des bains successifs a permis l'élimination des bactéries dans les deux derniers bains (première méthode). Dans les conditions naturelles, il semble improbable que l'utérus des vaches donneuses brucelliques contiennent des quantités aussi importantes de brucella.

Cependant, par mesure de sécurité et pour éviter tout risque de contamination par brucella, il est recommandé de laver les embryons récoltés dans dix bains successifs de tampon phosphate stérile.

CONCLUSION

En conclusion, il nous paraît possible d'utiliser des vaches brucelliques de haute valeur génétique comme donneuses d'embryons même si leur utérus héberge des brucella, sans risque de transmission de cette maladie aux receveuses et aux futurs produits, à condition de respecter un protocole identique à celui qui est proposé ici et de transférer des embryons à zone pellucide intacte.

REMERCIEMENTS

Nous avons apprécié les conseils et l'aide dans l'interprétation des résultats apportés par le Docteur Vétérinaire P. HUMBLLOT. Qu'il soit ici très sincèrement remercié.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALEXANDER (B.), SCHNURRENBERGER (P.R.) et BROWN (R.R.). — Numbers of *Brucella abortus* in the placenta, umbilicus and fetal fluid of two naturally infected cows. *Vet. Rec.*, 1981, 108, 500.
- ALTON (G. G.) et JONES (L. M.). — La brucellose : Techniques de laboratoire. F.A.O. et O.M.S., 1968, Genève, 92 p.
- BIGGERS (J. D.), WHITTEN (W. K.) et WHITTINGHAM (D. A.). — The culture of mouse embryos in vitro. In : *Methods in mammalian embryology*. Edited by Joseph C. Daniel Jr., University of Colorado, 1971, 86-116.
- BIRCH (R. R.) et GILMAN (H. L.). — The agglutination test in relation to the persistence of *Bacterium abortus* in the body of the cow. *Ann. Rep.*, N.Y. State Vet. Coll. Cornell Univ., 1931, 56-88.
- BRINSTER (R. L.). — Studies on the development of mouse embryos in vitro. *J. exp. Zool.*, 1965, 158, 49-57.
- ELSDEN (R. P.), NELSON (L. D.) et SEIDEL (G. E.). — Embryo transfer in fertile and infertile cows. *Theriogenology*, 1979, 11, 17-25.
- FITCH (C. P.), DELEZ (A. L.) et BOYD (W. L.). — Duration of the elimination of *Bacterium abortus* in the vaginal and uterine discharges of infected cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1930, 76, 680-685.
- FITCH (C. P.), BOYD (W. L.), BISHOP (L. M.) et KELLY (M. D.). — Localisation of *Brucella abortus* in the bovine uterus. *Cornell Vet.*, 1939, 29, 253-260.
- HARE (W. C. D.). — Communication personnelle, 1983.
- HARE (W. C. D.). — Embryo transfer and disease transmission. In *Proc. 10th Intern. Congr. Anim. Reprod. and A.I.* (Urbana, U.S.A.), 1984, Vol. 1, IX, 1-IX, 8.
- KERR (W. R.), PEARSON (J. K. L.) et RANKIN (J. E. F.). — A brucellosis survey in dairy herds with particular reference to diagnostic methods including the vaginal mucus test. *Vet. Rec.*, 1958, 70, 503-509.

- LELLOUCH (J.) et LAZAR (P.). — Méthodes statistiques en expérimentation biologique. Edition Flammarion, 1974.
- MALLEK (Z.). — Choix sanitaire de la donneuse. Influence sur la production d'embryons viables et risques de contamination des receveuses. Maitrise ès Sciences vétérinaires. E.N.V.A., 1984 (71 pp.).
- MALLEK (Z.), GUÉRIN (B.), NIBART (M.), PAREZ (M.) et THIBIER (M.). — Analyse bactériologique des liquides de collecte et de transfert embryonnaire de vaches donneuses saines ou atteintes de métrite. *Elev. et Insém.*, 1984, 202, 15-22.
- NIBART (M.), BOUYSSOU (B.). — La transplantation embryonnaire chez les bovins. *Rec. Méd. Vet.*, 1981 157, 71-87.
- NIBART (M.), BOUYSSOU (B.), SCHWARTZ (J. C.) et DE BEM (R.). — Transplantation embryonnaire chez les bovins. *Elev. et Insém.*, 1982, 189, 3-13.
- PHILIPPON (A.), RENOUX (G.) et PLOMMET (M.). — II : Répartition des *Brucella abortus* dans l'organisme six semaines après le part et trois à cinq mois et demi après l'épreuve infectante. *Ann. Rech. Vét.*, 1980 a, 1, 203-213.
- PHILIPPON (A.), RENOUX (G.) et PLOMMET (M.). — Brucellose bovine expérimentale. III : Excrétion vaginale de *Brucella abortus* avant et après la mise-bas. *Ann. Rech. Vet.*, 1970 b, 1, 215-224.
- SCHROEDER (E. D.) et COTTON (W. E.). — Some facts about abortion disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1916, 50, 321-330.
- SINGH (E. L.), THOMAS (F. C.), PAPP-VID (G.), EAGLESOME (M. D.) et HARE (W. C. D.). — Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. I : the in vitro exposure of preimplantation bovine embryos to akabane, Blue Tongue and Bovine Viral diarrhea Viruses. *Theriogenology*, 1982, 17, 337-344.
- SINGH (E. L.), THOMAS (F. C.), PAPP-VID (G.), EAGLESOME (M. D.) et 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*, 1982, 18, 133-140.
- SINGH (E. L.), HARE (W. C. D.), THOMAS (F. C.) et 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 from donors shedding virus. *Theriogenology*, 1984 (in press).
- SINGH (E. L.). — Disease transmission. Embryo pathogen interactions in cattle. In Pro. 10th Intern. Congr. Anim. Reprod. and A.I. (Urbana, U.S.A.), 1984, Vol. 1, IX, 17 - IX, 24.
- STEFFAN (J.), ANDRIAMANGA (S.) et THIBIER (M.). — Treatment of metritis with antibiotics or prostaglandin F2 α and influence of ovarian cyclicity in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, 1984, 45, 1090-1094.
- STRINGFELLOW (D. A.), HOWELL (V. L.) et SCHNURRENBERGER (P. R.). — Investigations into the potential for embryo transfer from *Brucella abortus* infected cows without transmission of infection. *Theriogenology*, 1982, 18, 733-743.
- STRINGFELLOW (D. A.), SCANLAN (C. M.), HANNON (S. S.), PANANGALA (V. S.), GRAY (B. W.) et GALIK (P. A.). — Culture of uterine flushings, cervical mucus and udder secretions collected post-abortion from heifers artificially exposed to *Brucella abortus*. *Theriogenology*, 1983, 20, 77-83.
- VOELKEL (S. A.), STUCKEY (K. W.), LOONEY (C. R.), ENRIGHT (F. M.), HUMS (P. E.) et GOOKE (R. A.). — An attempt to isolate *Brucella abortus* from uterine flushing of brucellosis - reactor donor cattle. *Theriogenology*, 1983, 19, 355-366.
- WITTINGHAM (D. G.). — Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert.*, 1971, 30 (suppl. 14), 7-21.