

ARTICLES ORIGINAUX

Recherches immunologiques sur la péripneumonie

III. Isolement au Tchad de P.P.L.O. génitaux d'origine bovine

par J.M. VILLEMOT et A. PROVOST

INTRODUCTION

Le territoire du Tchad, qui s'étend de la zone saharienne à la forêt équatoriale, se divise, en trois grandes zones du point de vue de l'élevage :

1. La zone saharienne comprenant le nord des régions du Kanem, du Batha, d'Ouddaï et le Borkou-Ennedi-Tibesti. C'est une zone sans zébus ; l'élevage du bœuf y est limité à quelques pâturages où l'eau est suffisamment abondante. L'élevage du chameau représente la seule richesse des populations arabes et toubous qui l'habitent.

2. La zone sahélienne qui ceinture le Tchad en une large bande, avec les parties centrales des régions du Kanem et du Batha, la presque totalité des régions du Chari-Baguirmi, du Ouddaï et du Salamat. Arabes et Foulbés, les grands éleveurs de cette zone, y pratiquent une transhumance imposée par la nécessité de rechercher des pâturages, par le régime des précipitations, donc par les points d'eau. C'est la grande zone d'élevage du bœuf (zébu arabe, zébu fellata et bœuf kouri), du cheval et du mouton. Les pâturages et les points d'eau y sont relativement abondants, et les glossines n'existent que dans quelques régions limitées.

3. La zone subéquatoriale comprend les parties méridionales du Ouddaï, du Salamat, les régions du Mayo-Kebbi, du Logone et du Moyen-Chari. Mis à part les grands troupeaux des Fellatas et des Massas du Mayo-Kebbi, on rencontre peu de zébus dans cette zone. Les popu-

lations qui possèdent quelque élevage sont avant tout des cultivateurs ; leurs mœurs sédentaires et leur ignorance des pratiques d'élevage en font de mauvais éleveurs.

Les régions d'élevage les plus riches du Tchad sont le Batha, le Kanem et l'Ouddaï.

La recherche des Pleuropneumonia-like organisms (P.P.L.O.) dans le tractus génital des femelles zébu arabe a été faite dans la région du Batha d'une part, sur 109 vaches du Ranch d'Elevage de l'Ouadi Rimé (à 80 kilomètres au nord-est d'Ati) et sur 25 femelles du Ranch de la Compagnie Pastorale d'Elevage près de Massakory. Ces femelles avaient entre trois et huit ans, et pour la très grande majorité d'entre elles étaient âgées de six ans. Nous avons isolé des P.P.L.O. d'origine génitale sur 34 vaches du Ranch de l'Ouadi Rimé, soit 21 p. 100, et sur 5 vaches du Ranch de la Pastorale, soit 20 p. 100. Il convient de remarquer la similitude des pourcentages obtenus sur des prélèvements faits à plus de 300 kilomètres de distance ; bien que le nombre des prélèvements faits ne permette pas une étude statistique, nous pouvons dire qu'environ une vache zébu arabe sur cinq héberge des P.P.L.O. dans son tractus génital.

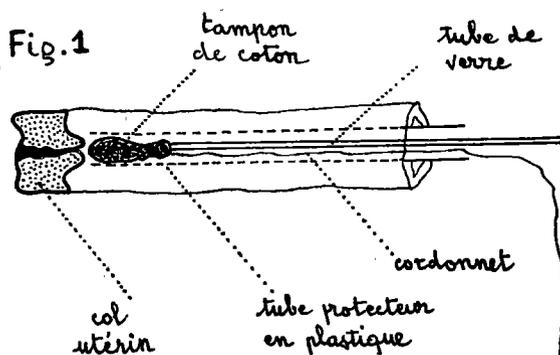
Nous décrivons la technique que nous avons utilisée pour isoler ces P.P.L.O. génitaux, et le typage de dix souches que nous avons considérées comme les plus intéressantes. Ce travail ne constitue que le préambule à une étude en cours sur les caractères antigéniques des organismes du type de la péripneumonie, dont quelques articles sont déjà parus (1, 2, 3).

MATERIEL ET METHODES

I. Techniques de prélèvement.

Nous avons utilisé conjointement deux méthodes :

a) *Méthode du tampon.* Nous nous sommes inspirés du dispositif décrit par Götze (4) : une canne de verre de 6 mm de diamètre, bouchée par un tampon de coton à son extrémité proximale, porte à son autre extrémité un tampon de gaze serré et attaché sur la moitié de sa longueur par un cordonnet de 50 cm environ. Un tube protecteur en plastique de 40 cm de longueur et de 2 cm de diamètre, bouché à ses deux extrémités par du coton, laisse dépasser l'extrémité proximale de la canne de verre



Dispositif de Götze (méthode du tampon)

qui sert de mandrin (fig. 1). Ce dispositif est aisément stérilisable.

La queue de la femelle étant tenue par un aide, on procède à une toilette vulvaire sommaire. On enduit ensuite de glycérine le tube protecteur et après avoir enlevé le tampon de coton obturant l'extrémité distale ou antérieure du tube, on introduit le dispositif dans le vagin jusqu'au col. On chasse alors le tampon de gaze au moyen du mandrin, et l'on retire tube et mandrin. Le tampon reste ainsi au niveau du col tandis que le cordonnet dépasse de la vulve. Le tampon est maintenu en place dix minutes, après lesquelles une légère traction imprimée au cordonnet permet de récupérer le tampon imprégné de mucus qui sert aussitôt à l'ensemencement.

b) *Méthode de la pipette.* Nous avons repris le dispositif de Terpstra et Eisma (4), dispositif également stérilisable. Il comporte un tube en matière plastique de 50 cm de longueur et de 0,5 cm de diamètre, relié à une poire en caoutchouc. Le prélèvement du mucus vaginal a lieu ici par aspiration et non plus par imprégnation.

2. Milieux d'ensemencement.

Le mucus cervical recueilli est directement ensemencé dans des boîtes de Pétri contenant le milieu suivant :

Bacto PPLO broth with crystal violet	21 g
Bacto Agar	25 g
Bacto yeast extract dehydrated	5 g
Eau	1.000 ml

Juste avant l'emploi, on ajoute 10 p. 100 de sérum de cheval, et 200 U de pénicilline par ml de milieu. L'ensemencement se fait en raclant légèrement la surface du milieu avec le tampon de gaze tenu par une pince stérile lorsqu'on emploie la méthode du tampon ; dans la méthode de la pipette, le mucus est refoulé sur le milieu par compression de la poire et on le répartit à la surface de celui-ci au moyen d'une anse de platine.

3. Isolement.

Les boîtes de Pétri ensemencées sont laissées à l'étuve à 37°C pendant une semaine, et elles sont examinées avec soin tous les jours. Malgré la sélectivité du milieu, comme nous avons dû opérer nos prélèvements près des parcs de vaccination dans la poussière soulevée par les animaux, nous n'avons pas pu éviter de nombreuses contaminations dues surtout à des germes du genre *Bacillus* et à des Mycétales. Un examen attentif à la loupe permet de repérer l'aspect morphologique caractéristique des colonies de P.P.L.O. qui apparaissent en 48 à 76 heures.

A la méthode d'isolement décrite par Edward (5) qui fait des repiquages en milieu solide, nous avons préféré le repiquage des colonies isolées en bouillon-sérum. Chaque colonie mamelonnée de 0,5 mm de diamètre au maximum, incluse dans la gélose et apparue en 48 heures, est aspirée dans l'effilure d'une pipette Pasteur stérile et dissociée dans 3 ml du milieu de culture liquide que Provost et Queval ont décrit ailleurs (1), additionné de sérum de cheval et de pénicilline.

Un examen direct au microscope à contraste de phase permet alors de s'assurer qu'il s'agit bien de germes du type de la péripneumonie. Les tubes de bouillon sont incubés à l'étuve à 37°C pendant 3 à 4 jours, et des passages sont faits tous les 4 jours jusqu'à une croissance satisfaisante des organismes, contrôlée par un examen direct au contraste de phase. Dès lors, les repiquages sont opérés dans 12 ml de bouillon-sérum; ceux-ci sont incubés 3 jours à 37°C, après quoi ils sont gardés 10 à 15 jours à + 4°C puis repiqués à nouveau.

CARACTERISATION DES SOUCHES

Afin de pouvoir situer les souches que nous avons isolées dans la classification d'Edward et Freundt (6), nous avons repris les travaux d'Edward (5) sur les caractères biologiques des P.P.L.O. Notre étude a porté sur onze souches qui nous ont paru particulièrement intéressantes :

souches 12, 35, 37, 75, 76 et 106 isolées au Ranch de l'Ouadi Rimé,

souches III, V, XI, XII et XV du Ranch de la Pastorale.

Le repiquage en série de ces souches sur milieu au sérum dépourvu d'antibiotiques a éliminé la

possibilité d'organismes L. Un certain nombre de passages, variable selon les souches, a été nécessaire pour adapter ces organismes aux milieux et obtenir une croissance permettant l'étude de leurs caractères biologiques.

1. Culture en milieu liquide.

Certaines de nos souches, malgré de fréquents repiquages, n'ont donné jusqu'ici qu'une légère opalescence en bouillon-sérum, alors que d'autres cultivaient abondamment en 24 heures. La culture des organismes peut être uniforme dans tout le tube, ou présenter une tendance à l'aérobiose et ne cultiver que près de la surface. Certaines souches enfin donnent une croissance granuleuse; un dépôt abondant se constitue en quelques jours et l'agitation du tube montre alors des amas en granulations. D'autres souches ne donnent pas de dépôt (croissance « smooth »).

Les caractères de culture en milieu liquide sont indiqués dans le tableau I, ainsi que les exigences en sérum de ces souches.

2. Action sur les hydrates de carbone.

Alors qu'Edward (7) étudie l'action fermentaire des P.P.L.O. sur milieu solide, nous avons pensé que nos souches, constamment repiquées en bouillon-sérum et non sur milieu gélosé,

TABLEAU I

CARACTÈRES CULTURAUX EN BOUILLON-SÉRUM ET BESOINS EN SÉRUM DE 11 SOUCHES DE P.P.L.O. GÉNITAUX ISOLÉS SUR DES VACHES ZÉBU-ARABE AU TCHAD

	III(17)	V(17)	XI(17)	XII(17)	XV(17)	12(17)	35(17)	(37(14)	75(14)	76(14)	106
Culture	riche	riche	riche	riche	pauvre	riche	riche	pauvre	pauvre	pauvre	pauvre
Besoin en sérum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance	gr.	gr.	gr.	gr.	sm.	gr.	sm.	sm.	sm.	sm.	sm.
Caractères d'aérobiose	aé.	aé.	aé.	aé.	aé.-an.	aé.	aé.-an.	aé.-an.	aé.-an.	aé.-an.	aé.-an.

Abréviations gr. : granuleuse sm. : smooth aé. : aérobie aé.-an. : aéro-anaérobie
Entre parenthèses est indiqué le nombre de passages effectués pour chaque souche.

s'étaient suffisamment bien adaptées à ce milieu pour permettre une étude des caractères fermentaires sur les glucides.

Cette méthode permettait à nos yeux une rapidité d'exécution et une simplicité plus grandes. Le milieu utilisé restait le bouillon-sérum précédemment décrit, additionné de 0,005 p. 1.000 de rouge de phénol et de 1 p. 1.000 d'hydrate de carbone.

Les résultats obtenus sont figurés dans le tableau 2. Nous y avons inclus l'étude des caractères fermentaires de deux souches de *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* (souche Maroua, isolée au laboratoire de Farcha, et souche vaccinale T3) et de la souche Vom (à son 80^e passage) de *M. mycoides* var. *capri*.

Cinq souches ne fermentent aucun glucide ; il s'agit de souches qui par ailleurs cultivent pauvrement en bouillon-sérum.

3. Réduction du bleu de méthylène.

Edward (7) rapporte l'observation de Warren selon laquelle une souche de P.P.L.O. isolée d'une arthrite du rat a un pouvoir de réduction du bleu de méthylène qui diminue avec l'atténuation de la virulence par subcultures. Quoiqu'il en soit, l'activité réductrice des germes est en liaison directe avec leur potentiel d'oxydo-réduction et il est intéressant de reprendre ce test. Celui-ci est effectué dans des tubes de Kahn contenant 3 ml de bouillon-sérum additionné de 0,4 ml d'une solution à 1/10.000 de

TABLEAU II

CARACTÈRES FERMENTAIRES SUR LES GLUCIDES
DE 11 SOUCHES DE PPLO GÉNITAUX ISOLÉES AU TCHAD SUR DES VACHES ZÉBU-ARABE

	glucose	lactose	lévulose	mannite	arabino- nose	galac- tose	maltose	xylose	amidon	saccha- rose
III(17)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
V(17)	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
XI(17)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
XII(17)	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
XV(17)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12(17)	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
35(17)	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
37(14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75(14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76(14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105(11)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>M. mycoides</u> souche T 3	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<u>M. mycoides</u> souche Maroua	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<u>M. capri</u> souche Vom	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+

bleu de méthylène. L'incubation a lieu à 37°C, et les tubes sont examinés tous les jours pendant une semaine. Les résultats sont indiqués dans le tableau 3.

4. Hémolyse des globules rouges de cheval.

Nous avons repris la technique d'Edward (7) : les souches sont cultivées pendant 48 heures dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose-sérum additionnée de pénicilline. On verse ensuite à leur surface une fine couche de ce même milieu renfermant 5 p. 100 d'une suspension de globules rouges de cheval. Après 2 jours d'incubation à 37°C, l'hémolyse se traduit par une zone nette de décoloration autour des colonies. Les résultats sont indiqués dans le tableau 3.

DISCUSSION

En 1947, Edward, Hancock et Hignett (8) ont décrit, les premiers, des organismes du type de la péripneumonie isolés du tractus génital des bovidés. Par la suite, Edward (5) put différencier

ces germes en deux variétés : « S » saprophyte et « P » pathogène, qu'il a repris avec Freundt sous la dénomination de *Mycoplasma laidlawi* et *Mycoplasma bovigenitalium*. Les souches de la variété S seraient des hôtes commensaux du tractus génital des bovidés, alors que celles de la variété P provoqueraient des inflammations génitales pouvant amener la stérilité. Certains caractères culturels permettent de différencier ces deux variétés : les souches S cultivent sur des milieux dépourvus de sérum et possèdent le pouvoir de fermenter certains sucres, alors que les souches P ont besoin de sérum pour leur croissance et ne fermentent aucun glucide.

Toutes les souches que nous avons isolées ont besoin de sérum pour leur culture ; cependant six d'entre elles ont des caractères fermentaires qui écartent l'idée qu'il puisse s'agir de souches P. Nous pensons plutôt que ces souches, encore sauvages, n'ont pas acquis tous leurs caractères biologiques et sont encore trop étroitement adaptées au milieu sérum.

Par contre, cinq souches : XV, 37, 75, 76 et 106 se montrent de vraies souches P.

TABLEAU III

ACTION RÉDUCTRICE SUR LE BLEU DE MÉTHYLÈNE ET HÉMOLYSE DES GLOBULES ROUGES DE CHEVAL

	III(17)	V(17)	XI(17)	XII(17)	XV(17)	12(17)	35(17)	37(14)	75(14)	76(14)	106(11)
Réduction du bleu de méthylène	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Hémolyse des globules rouges de cheval	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

BIBLIOGRAPHIE

1. A. PROVOST et R. QUEVAL. — *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1957, **10**, 357.
2. A. PROVOST. — *C.R. Acad. Sciences*, 1958, **246**, 1323-6.
3. A. PROVOST. — *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1958, **11**, 5.
4. GOTZE, cité par LAGNEAU. — *Rec. Méd. vét. Alfort*, 1957, **133**, 954.
5. D.G.ff. EDWARD. — *J. gen. Mic.*, 1950, **4**, 4.
6. D.G.ff. EDWARD et E.A. FREUNDT. — *J. gen. Mic.*, 1956, **14**, 197.
7. D.G.ff. EDWARD. — *J. gen. Mic.*, 1950, **4**, 311.
8. D.G.ff. EDWARD, J.L. HANCOCK et S.L. HIGNETT. — *Vet. Record*, 1947, **59**, 329.

SUMMARY

Studies on immunity in contagious bovine pleuropneumonia

III. Isolation of P.P.L.O. of bovine genital origin in Tchad

A survey was carried out in Tchad on the existence of P.P.L.O. in the genital tract of 134 bovines of the local Zebu breed, aged 3-8 years. Thirty nine different strains were isolated. Eleven of these were subject to further biological and antigenic studies. The characters of 6 isolates identified them as *Mycoplasma laidlawi* (variety S of Edwards) and the remaining 5 isolates were identified as *Mycoplasma bovigenitalium* (variety P of Edwards). The purpose of the paper is to describe the isolation for the first recorded time in Africa of P.P.L.O. from bovine genitalia and to indicate that the findings will be used for an extensive immunological investigation on the specificity of the rapid slide agglutination diagnostic test in bovine pleuropneumonia.

RESUMEN

Investigaciones inmunológicas de la perineumonía

III. Aislamiento en el Tchad de P.P.L.O. genitales de origen bovino.

Los autores han investigado en el Tchad la presencia de P.P.L.O. genitales, en el aparato genital de 134 vacas zebú árabe de 3 à 8 años. Treinta y nueve cepas han sido aisladas, de las cuales once han sido reservadas a fines de estudios biológicos y antigénicos. Los caracteres de las cepas permiten colocar seis en el género *Mycoplasma laidlawi* (variedad S de Edward). El objeto de este trabajo es de una parte describir el aislamiento por primera vez en Africa de P.P.L.O. en las vías genitales de los bóvidos, y de otra parte permitir una vasta investigación inmunológica acerca de la especificidad de la reacción de aglutinación rápida sobre porta-objetos en el diagnóstico de la perineumonía bovina.