



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4252](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID%3A4252)

To cite this version :

UHART, Maia. *Chlamyphilose abortive ovine : études à propos d'une suspicion de résistance de Chlamyphila abortus au vaccin vivant thermosensible dans des élevages ovins laitiers du rayon de Roquefort* . Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2009, 104 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

Chlamyphilose abortive ovine :
études à propos d'une suspicion de résistance de
***Chlamyphila abortus* au vaccin vivant**
thermosensible dans des élevages ovins laitiers du
rayon de Roquefort.

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Maia UHART

Née le 01/01/1984 à Saint Palais (64)

Directeur de thèse : M. le Professeur Xavier BERTHELOT

JURY

PRESIDENT :

M. Henri DABERNAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Xavier BERTHELOT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

M. Dominique BERGONIER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

A Monsieur le Professeur Henri DABERNAT

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Bactériologie – Hygiène

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux,

A Monsieur le Professeur Xavier BERTHELOT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologies du bétail – Reproduction

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse,

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à cette thèse, pour votre confiance, votre disponibilité et votre soutien,

Sincère reconnaissance,

A Monsieur le Professeur Dominique BERGONIER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologies du bétail – Reproduction

Qui nous a fait l'honneur de prendre part à notre jury de thèse,

Sincères remerciements,

A Madame Annie RODOLAKIS

Je te remercie du fond du cœur de m'avoir guidée tout au long de ce travail, non seulement pendant que j'étais à tes côtés, période à laquelle j'ai pu jouir de tes enseignements et de ta sympathie, mais aussi pour tout le temps que tu as consacré à la correction de mon manuscrit.

A Monsieur Damien REMMY

Je vous remercie vous, ainsi que le laboratoire CEVA, pour votre intérêt envers la filière ovine en France ainsi que pour votre soutien moral et financier sans lesquels cette étude n'aurait pu avoir lieu.

A Madame Elisabeth LEPETICOLIN

Pour votre confiance et votre engagement.

A tous les éleveurs avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Pour votre participation à cette étude, votre intérêt et votre disponibilité. J'espère que nous avons réussi à répondre à vos questions et que cette étude constituera un premier pas vers l'amélioration de vos performances.

A Caroline, à qui je dois tout ça. Merci de m'avoir toujours tirée vers le haut et d'avoir toujours su être présente, patiente et compréhensive envers moi. Merci d'avoir appris à me connaître vraiment et de m'avoir fait confiance, de m'avoir fait partager un peu de ton shakra et beaucoup de ta joie de vivre. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites tant ... et j'espère être très bientôt marraine (garçon ou fille, peu importe, ça ira) !

Amama Añari, hitza hitz.

Etxekoer, Evelyne eta Patrick-i, zuen gabe ez bainuen deus egiten ahal. Ikusten, azkenian heldia niz ! Egun batez, bainan espero dut ez ziztela sekulan beharrezkoan izanen, ni niz hor izanen zuentzat.

Kattin-i, ene betiko « Pittittun », ta J.B.-ri, ehun urtez elgar maitez !

A Gaëlle, pour ton soutien et ton amitié fraternelle. Que la force soit toujours avec toi ! Sérénité et chance en amour, on finira bien par trouver le bon !

A Clélia, ma petite sœur féérique qui m'a tiré d'un bon pétrin. Ne change jamais et compte sur moi pour pourfendre les ogres et autres mauvais esprits qui oseraient se mettre en travers de ton chemin. A Mennad et Brahim, qui avez le cœur sur la main, Barraca !

A ma petite Noémy, que tu puisses éternellement continuer à vivre tes rêves, il me tarde que nos routes se recroisent.

Ene euskal diazporrari : Josi, Kikou, Oihana, Bixente, Hélène, Alain, Michel, Sébastien, Largotei, Amaia ta beste guztiak.

Au petit peuple de Microcosmos et à tous ses satellites, avec une spéciale dédicace à Estelle et Marco.

Ta bistan dena, Patxari.

Table des matières

Introduction à la thèse	14
Partie 1 : Quelques notions sur la Chlamydoophilose Abortive Ovine.....	16
I. Présentation de la Chlamydoophilose Abortive Ovine	17
a) Etiologie	17
b) Conséquences de l'infection d'un troupeau de brebis par <i>C. abortus</i>	17
II. Prévention de la chlamydoophilose par la vaccination	18
Partie 2 : Enquête sur la persistance d'avortements imputés à la Chlamydoophilose dans des élevages ovins laitiers du rayon de Roquefort malgré la vaccination depuis plusieurs années avec un vaccin vivant.	22
I. Présentation des élevages enquêtés	23
II. Etablissement de l'enquête	24
III. Lien entre les avortements constatés ces dernières années dans les neufs élevages et la chlamydoophilose.....	25
IV. Analyse des schémas de vaccination de ces élevages	28
a) Le protocole de vaccination	28
b) Respect de ce protocole.....	29
V. Pratiques d'élevage contribuant à la pérennisation d'une infection par <i>C. abortus</i> dans les élevages.....	30
a) Facteurs de risque d'introduction de <i>C. abortus</i>	30
b) Facteurs de risque de diffusion de <i>C. abortus</i>	30
• Diffusion dans le troupeau	30
• Transmission aux agnelles de renouvellement.....	31
VI. Proposition de mesures visant à contribuer à l'assainissement des cheptels	32
a) Mesures prophylactiques.....	32
b) Conduite à tenir en période d'agnelage.....	33
VII. Conclusions relatives à cette enquête.....	34

Partie 3: Etude expérimentale visant à isoler des souches <i>C. abortus</i> locales dans le but tester l'efficacité du vaccin vivant thermosensible 1B à partir d'un modèle murin.	36
Matériels et méthodes.....	37
I. Prélèvement de <i>C. abortus</i> chez les brebis présentant des signes cliniques compatibles avec la chlamydophilose	37
II. Isolement et multiplication des <i>C. abortus</i>	38
III. Caractérisation de l'espèce des <i>Chlamydomphila</i> isolées.....	39
IV. Utilisation d'un modèle murin pour l'étude de l'efficacité du vaccin Cevac Chlamydia ND sur des souches <i>C. abortus</i>	39
a) Détermination de la dose abortive de <i>C. abortus</i>	40
b) Détermination de l'efficacité du vaccin vivant Cevac Chlamydia ND	41
V. Dosage des anticorps par ELISA	41
Résultats	43
I. Descriptif des écouvillons vaginaux obtenus	43
II. Choix des écouvillons vaginaux pour l'inoculation des cultures cellulaires	45
III. Isolement de <i>Chlamydomphila</i> sur culture cellulaire à partir des écouvillons vaginaux	46
IV. Isolement de <i>C. abortus</i> par culture sur œufs embryonnés	47
a) Succès de l'isolement de la souche AB 22.....	47
b) Caractérisation RFLP de la souche AB 22.....	50
c) Détermination de la concentration des cultures en <i>Chlamydomphila</i>	52
• Par la technique des plages de lyse	52
• Par PCR.....	53
V. Détermination de la dose abortive de <i>C. abortus</i> pour les souris.....	55
VI. Efficacité du vaccin vivant Cevac Chlamydia ND vis-à-vis de la souche AB 22	57
Discussion	61
Conclusion de la thèse.....	64
Références bibliographiques	66

Annexe 1 : Compléments d'informations sur la Chlamydophilose Abortive Ovine.	74
Annexe 2 : Prise et conservation des échantillons de mucus vaginaux	80
Annexe 3 : Isolement sur culture cellulaire et dénombrement des <i>C. abortus</i> par la technique des plages de lyse.	82
Annexe 4: Isolement des <i>Chlamydia</i> sur œuf embryonné. Protocole d'inoculation des œufs. [d'après Rodolakis et Souriau, 1997]	86
Annexe 5 : Identification de <i>C. abortus</i> par PCR et RFLP.	90
Annexe 6 : Utilisation d'un modèle murin pour déterminer l'efficacité du vaccin vivant thermosensible contre <i>C. abortus</i>	96
Annexe 7 : Mise en évidence de la présence d'anticorps sériques anti <i>C. abortus</i> chez des souris vaccinées à l'aide du kit de diagnostic rapide Chekit TM	98
Annexe 8: Résultats de la première mise en culture sur œufs embryonnés des souches <i>C. abortus</i> isolées.	100
Annexe 9: Résultats de la seconde mise en culture sur œufs embryonnés des souches <i>C. abortus</i> isolées.	102
Annexe 10: Résultats de la troisième mise en culture sur œufs embryonnés des souches AB 21 et AB 23.	104

Table des figures

Tableau 1 : Présentation des élevages enquêtés : adresse et composition des cheptels avec dates prévues des mises bas sur les adultes et les agnelles.	23
Tableau 2 : Récapitulatif des résultats moyens de reproduction des neuf élevages depuis la mise en place d'un protocole de vaccination contre la chlamydiafilose avec un vaccin vivant, liste des années où des avortements ont été imputés à la chlamydiafilose, à la fièvre Q et à la toxoplasmose.....	26
Tableau 3 : Composition des lots de souris gravides inoculées avec différents de dilution des souches de <i>C. abortus</i> AB 22 et AB 7.....	40
Tableau 4 : Composition des lots de souris gravides, préalablement vaccinées ou pas, et inoculées avec les souches AB 22 et AB 7.	41
Tableau 5: Identité des brebis écouvillonnées pour envoi d'un échantillon à l'INRA et résultats d'analyse PCR en temps réel des écouvillons envoyés au laboratoire Scanelis pour diagnostic direct d'avortement à <i>C. abortus</i>	43
Tableau 6: Brebis dont les écouvillons ont été choisis pour inoculer les cultures cellulaires..	46
Tableau 7 : Résultats du comptage des plages de lyses obtenues après inoculation des cultures cellulaires par les surnageants d'essorage des écouvillons vaginaux et leurs dilutions	47
Tableau 8: Estimation de la concentration en <i>Chlamydiafila</i> dans les surnageants des membranes vitellines des œufs 15 183, 15 232, 15 172, 15 248, 15 259 et 15 243 par la méthode des plages de lyses.....	53
Tableau 9: Effets de l'inoculation de souris gravides par les souches <i>C. abortus</i> AB 22 et AB 7 sur la suite de leur gestation.	55
Tableau 10: Titres en anticorps anti- <i>C. abortus</i> des sérums des souris prélevées à 10 ± 1 jours de gestation (titre Ac 1) et autour des mises bas (titre Ac 2).	57
Tableau 11: Effets de l'inoculation de souris vaccinées ou non vaccinées à 10 ± jours de gestation par les souches AB 22 et AB 7.	58
Tableau 12 : Caractéristiques des souches utilisées comme témoins positifs de PCR	93
Tableau 13: Interprétation des tests ELISA Chekit- <i>Chlamydiafila</i> souris	99

Figure 1 : Amplification par PCR d'une fraction du gène <i>ompA</i> de la culture 15 183 de la souche AB 22 et des cultures 15 172, 15 228, 15 248 et 15 251 de la souche AB 21.	48
Figure 2 : Amplification par PCR d'une fraction du gène <i>ompA</i> des cultures 15 183, 15 282, 15 286, 15 294, 15 296, 15 297, 15 305 et 15 359 de la souche AB 22 et de la culture 15 333 de la souche AB 21.....	50
Figure 3 : Amplification par PCR de l'espace intergénique 16S-23S de la culture 15 183 de la souche AB 22.	51
Figure 4 : Amplification par PCR d'une fraction du gène <i>ompA</i> de la culture 15 183 de la souche AB 22.	51
Figure 5 : Profil de restriction du gène <i>ompA</i> de la culture 15 183 de la souche AB 22 amplifié par PCR et digéré par l'enzyme de restriction <i>Alu</i> I.	52
Figure 6 : Estimation par PCR (en diluant l'ADN) de la concentration en <i>Chlamydomphila</i> de la culture 15 183 de la souche AB 22, des cultures 15 172, 15 228, 15 248 et 15 251 de la souche AB 21 et de la culture 15 410 de la souche AB 7.	54
Figure 7 : Nombre médian de souriceaux vivants par portée après une inoculation intrapéritonéale de souris à 10±1 jours de gestation par trois doses de <i>C. abortus</i> AB 7 et AB 22.....	56
Figure 8: Nombre médian de souriceaux vivants par portée dans des lots de souris vaccinées et non vaccinées, après une inoculation intrapéritonéale à 10 ± 1 jours de gestation par les souches AB 22 et AB 7.	59

Introduction à la thèse

Les éleveurs du GAEC (Groupement Agricole d'Exploitation en Commun) des Mazes s'étaient plaints auprès du laboratoire commercialisant le vaccin vivant CEVAC ChlamydiaND au sujet de la persistance d'avortements dans leur élevage de brebis laitières malgré la vaccination des animaux contre la chlamydiafilose. Quelques cas similaires de diagnostics d'avortements à *Chlamydomphila abortus* dans des élevages qui pratiquent la vaccination avec un vaccin vivant depuis de nombreuses années avaient été relatés parmi les adhérents à la coopérative UNICOR de la zone Roquefort. Les vétérinaires de la coopérative UNICOR, et en particulier le Dr. Lepetitcolin, avaient alors tenté de mettre en place une étude en 2005-2006 pour tester l'efficacité du vaccin sur des souches *C. abortus* locales, en partenariat avec le Dr. Remmy du laboratoire CEVA et Mme Rodolakis, directrice de recherches à l'INRA de Nouzilly. Des écouvillons vaginaux effectués sur des brebis ayant avorté au Gaec des Mazes et au Gaec Aubépine avaient été envoyés en 2006 à Mme Rodolakis. Aucune souche n'avait pu être isolée à l'époque à cause d'une conservation et d'un transport des échantillons inadaptés à la survie des bactéries.

Cette étude de cas a été relancée fin 2007 avec les mêmes partenaires puisque le problème d'avortements décrit ci-dessus perdure dans une dizaine d'élevages. Le Dr. Lepetitcolin m'a donc proposé de participer à une enquête sur cette problématique d'avortements dans neuf élevages de la zone Roquefort et d'en faire ma thèse de doctorat vétérinaire.

L'objectif de l'enquête est de déterminer s'il existe des facteurs de risques communs entre ces élevages dans la conduite de la reproduction et lors des mises bas ainsi que dans le protocole de vaccination qui pourraient expliquer le fait que l'on retrouve encore des avortements à *C. abortus* malgré la vaccination des animaux.

Une seconde hypothèse a été émise sur l'origine de la persistance d'avortements à *C. abortus* chez des brebis vaccinées. L'émergence d'une souche *C. abortus* particulière en Aveyron pourrait expliquer que l'immunité conférée par le vaccin vivant thermosensible 1B produit par mutation de la souche *C. abortus* AB 7 soit moins efficace sur cette dite souche. Il

a donc été décidé de tenter d'isoler des souches de terrain et d'explorer cette hypothétique résistance à l'aide d'un modèle expérimental murin à l'INRA de Nouzilly.

Partie 1 : Quelques notions sur la Chlamyphilose Abortive

Ovine

I. Présentation de la Chlamyphilose Abortive Ovine

a) Etiologie

La Chlamyphilose Abortive Ovine, aussi nommée Enzootic Abortion of Ewes, est due à une bactérie à gram négatif intracellulaire obligatoire, *C. abortus*, appartenant à la classe des *Chlamydiae*, à l'ordre des *Chlamydiales* et à la famille des *Chlamydiaceae*. Cette bactérie se présente sous deux formes : le corps élémentaire (200-300 nm), infectieux, métaboliquement inactif et résistant dans le milieu extérieur, et le corps réticulé (500-1600 nm), intracellulaire, non infectieux, métaboliquement actif et sensible à certains antibiotiques. (Aitken, 2000, Entrican et al., 2001, Nietfeld, 2001, Andersen, 2004, Rekiki, 2004, Thomson et al., 2005, Caro et al., 2008)

La répartition de cette bactérie est mondiale et elle représente la première cause d'avortements chez les ovins en Aveyron comme au niveau national. *C. abortus* est principalement impliquée dans des cas d'avortements enzootiques et d'hypofertilité chez les ruminants mais elle aussi transmissible à de nombreuses autres espèces dont l'Homme et constitue à ce titre un risque pour les femmes enceintes (Johnson et al., 1985, Wong et al., 1985, Rodolakis et al., 1998, Aitken, 2000, Entrican et al., 2001, Nietfeld, 2001, Berri et al., 2004). *C. abortus* provoque aussi des arthrites, des pneumonies ou des conjonctivites (Rodolakis et al., 1998, Nietfeld, 2001, Andersen, 2004, Rekiki et al., 2003) mais nous nous focaliseront dans notre étude sur les problèmes directement liés à la reproduction car ils sont la principale cause de pertes économiques liées à une infection du troupeau par la chlamyphilose.

b) Conséquences de l'infection d'un troupeau de brebis par *C. abortus*

La chlamyphilose est avant tout responsable d'avortements en fin de gestation mais elle entraîne aussi la naissance à terme d'agneaux morts nés ou chétifs et difficiles à élever. Les avortements peuvent prendre un caractère enzootique lors de la primo-infection d'un troupeau avec des taux atteignant les 30% des brebis gravides. (Rodolakis et al., 1998, Aitken, 2000, Nietfeld, 2001)

La diffusion de l'infection par *C. abortus* au sein du troupeau s'établit progressivement d'année en année si aucune mesure de prophylaxie n'est mise en place. La

conduite intensive des troupeaux de brebis pratiquée dans le rayon de Roquefort (France, 12) augmente le risque de transmission horizontale de l'infection.

Une transmission verticale de *C. abortus* peut se traduire par la mise bas d'agneaux vivants et infectés de façon inapparente. Ces agneaux porteurs pourront excréter à leur tour des *C. abortus* et contribuent alors à la pérennisation de l'infection dans le troupeau. Les agnelles infectées in utero avorteront au cours de leurs premières saisons de mise bas. (Rodolakis et al., 1998, Aitken, 2000, Nietfeld, 2001)

La chlamyphilose entraîne donc une baisse de prolificité mais aussi une baisse de fertilité des brebis, ce qui se solde par des pertes économiques parfois élevées pour les éleveurs. Le diagnostic de la chlamyphilose est impératif et doit être précoce pour permettre la mise en place de moyens de lutte efficaces pour éviter sa diffusion, en particulier aux agnelles de renouvellement.

Des informations complémentaires concernant l'épidémiologie, la pathogénie, la transmission et le diagnostic de la chlamyphilose sont présentées en annexe 1.

II. Prévention de la chlamyphilose par la vaccination

Le contrôle des avortements enzootiques fait appel à une amélioration des pratiques d'élevage, au traitement antibiotique et à l'utilisation de vaccins inactivés ou vivants atténués.

Contrairement à ce que l'on observe avec la toxoplasmose, la campylobactériose ou la border disease, la primo infection des agnelles dans un environnement contaminé n'entraîne pas d'immunité de prémunition, bien au contraire (Aitken, 2000). Une immunité efficace n'est obtenue qu'après une épreuve virulente massive et brutale (Rodolakis et Souriau, 1980). La prévention passe donc par la vaccination avec un vaccin vivant atténué, seul type de vaccin capable de reproduire l'immunité post-infection (Plommet, 1997, Rocchi et al., 2008).

Dans un premier temps, un vaccin inactivé a été découvert en 1951 par M. McEwen et M. Foggie puis mis sur le marché en France (Chlamyvox FQND) mais celui-ci n'entraîne pas de protection efficace contre le portage et l'excrétion de *Chlamyphila* et ne permet pas de prévenir tous les avortements. On aboutit alors l'apparition de phases d'infection endémiques.

(Rodolakis et Souriau, 1979 et 1980, Rodolakis et Bernard, 1984, Chalmers et al., 1997, Caro et al., 2001, Nietfeld, 2001, Rekiki et al., 2003, Andersen, 2004, Caro et al., 2008)

La découverte d'une souche *C. abortus* mutante thermosensible hypovirulente en 1979 a permis de commercialiser un vaccin vivant qui protège efficacement les brebis contre l'infection. Cette souche fut obtenue par mutagenèse de la souche de référence AB 7 après traitement à la N-méthyl-N'nitro-N-nitrosoguanidine (10 µg/mL) de cultures cellulaires McCoy inoculées 24h auparavant. (Rodolakis, 1983, Rodolakis et Souriau, 1983, Rodolakis et Bernard, 1984, Plommet, 1997, Andersen, 2004)

La souche AB 7 avait été isolée en 1972 à partir d'un placenta de brebis ayant avorté et fut entretenue depuis par des mises en culture en série sur des œufs embryonnés de poule (Faye et al., 1972). Cette souche est maintenant devenue la souche de référence française de la Station de Pathologie Infectieuse et Immunologie de l'INRA de Nouzilly (Rodolakis et al., 1976a, 1976b, 1981, 1983, 1989, Denamur et al., 1991, Caro et al., 2001, Rekiki et al., 2003 et 2004).

La souche vaccinale thermosensible 1B se multiplie normalement de 35 à 38°C sur culture de cellules McCoy (température permissive) mais cent fois moins que la souche sauvage AB 7 à 39,5°C (température restrictive) qui correspond à la température corporelle des brebis. La souche mutante se multiplie dans les organes internes des animaux inoculés mais elle persiste moins longtemps et elle est dix fois moins virulente que la souche sauvage AB 7 (Rodolakis, 1983).

L'innocuité et l'immunogénicité de cette souche mutante thermosensible en tant que vaccin a été étudiée pour permettre sa commercialisation. Les résultats de reproduction de souris inoculées avec différentes souches *C. abortus* à 11 jours de gestation, et vaccinées deux mois auparavant avec la souche mutante 1B, sont similaires à ceux obtenus avec des souris non inoculées (autour de 11-12 souriceaux vivants par portée, le jour du part et 8j plus tard). Ces mêmes résultats sont significativement différents de ceux obtenus avec des souris inoculées sans avoir été vaccinées (moins de 2 souriceaux par portée). Des expériences similaires effectuées sur des milliers de brebis ont démontré l'absence d'excrétion, de transmission *in utero* et de pathogénicité de la souche 1B après vaccination, les résultats de reproduction des brebis vaccinées étant identiques à ceux de brebis témoins non vaccinées. L'infection de ces brebis préalablement vaccinées par *C. abortus* n'a pas écourté leur gestation et n'a pas entraîné d'excrétion de bactéries à la mise bas, contrairement à l'infection

de brebis non vaccinées qui les a faites avorter. (Rodolakis, 1983, Rodolakis et Souriau, 1983, Rodolakis et Bernard, 1984, Chalmers et al., 1997, Plommet, 1997, Rodolakis et al., 1998)

La stabilité de ce vaccin vivant a été démontrée par l'évaluation de la virulence de la souche mutante 1B sur modèle murin, après des passages successifs de cette souche sur des cultures cellulaires, des souris et des agneaux (Rodolakis et al., 1998).

Ce vaccin vivant fut commercialisé au Royaume Uni dès 1993 sous l'appellation Ovilis ChlamydiaND. Il fut introduit en France le 20 décembre 1996 (Plommet, 1997) sous le nom Tecvax ChlamydiaND (n° AMM 6759252) et fut renommé Cevac ChlamydiaND (n° AMM 674287.2) après rachat des droits de production en 2001. On le retrouve aussi en France sous l'appellation Ovilis ChlamydiaND depuis le 06 octobre 1999 (n° AMM 676813.3). Le principe actif reste le même. La vaccination des brebis avec ce vaccin vivant induit une protection aussi forte que celle induite par une primo-infection (Rodolakis et Souriau, 1983). Les animaux vaccinés sont efficacement protégés au moins trois ans et on prévient ainsi les avortements et l'excrétion de *C. abortus* chez les animaux vaccinés initialement naïfs (Rodolakis et Souriau, 1983, Rodolakis et al., 1998, Andersen, 2004).

L'efficacité de ce vaccin a été démontrée expérimentalement à de multiples reprises sur des modèles murins ou ovins, vis-à-vis d'un large panel de souches *Chlamydophila* : des souches *C. abortus* ovines, caprines, bovines et d'antilopes, des souches *Chlamydophila pecorum* ovines et caprines... , et ce quelque soit leur origine géographique (Rodolakis, 1983, Rodolakis et Bernard, 1984, Plommet, 1997, Chalmers et al., 1997, Rekiki et al., 2003, Berri et al., 2004, Rekiki et al., 2004, Bouakane, 2005).

En cas d'avortement enzootique, Mme Rodolakis recommande de vacciner tous les animaux la première année puis seulement les agnelles de renouvellement les années suivantes (Rodolakis et al., 1998). En pratique, les animaux sont vaccinés un à deux mois avant la lutte. Si on considère que le taux de renouvellement est d'environ 25%, le cheptel est protégé au bout de quatre ans. Une autre stratégie consiste à ne vacciner que les agnelles mais on prolonge alors la durée nécessaire à la couverture vaccinale totale du troupeau. Le premier schéma a l'avantage de limiter l'excrétion par les brebis infectées latentes et la dissémination de l'infection parmi les adultes encore naïves. La vaccination de brebis déjà infectées ne pourra pas les empêcher d'avorter. La vaccination contre la chlamyphilose avec un vaccin vivant est donc la seule solution à l'assainissement d'un troupeau infecté mais elle atteint ses limites tant qu'il subsiste des animaux infectés latents (Bouakane et al., 2005).

Un rappel trois ans après la primo vaccination est conseillé (Aitken, 2000, Entrican et al., 2001, Bouakane et al., 2005).

Partie 2 : Enquête sur la persistance d'avortements imputés à la Chlamyphilose dans des élevages ovins laitiers du rayon de Roquefort malgré la vaccination depuis plusieurs années avec un vaccin vivant.

I. Présentation des élevages enquêtés

Durant l'hiver 2007-2008, des cas d'avortements ont été décrits dans neuf élevages de brebis situés dans la zone Roquefort. Une enquête a été menée auprès de ces éleveurs pour tenter d'expliquer ces cas d'avortements. Ces élevages n'ont pas été choisis au hasard parmi les adhérents de la coopérative UNICOR. En effet, des avortements ont régulièrement eu lieu dans ces élevages à chaque saison de mises bas et ils avaient été imputés à la chlamyphilose par différents tests diagnostiques, alors que les éleveurs pratiquent une vaccination des animaux contre la chlamyphilose avec un vaccin vivant depuis plusieurs années. Neuf éleveurs répondant à ces critères ont accepté de participer à notre étude. Les caractéristiques des ces neuf élevages et les dates prévues pour les mises bas des années 2007 et 2008 sont présentés dans le tableau 1.

Nom de l'élevage	Adresse et localisation	Taille du troupeau	Dates MB adultes	Dates MB agnelles
GAEC du Moulin	Vissac	165 Ad et 48 Ag TV	28/05/07 et 08/06/07 puis retours en septembre 07	
	Pont-de-Salars	262 Ad et 75 Ag TL	21/11/07 et 05/12/07 puis retours en mars 08	13/01/2008
Cabirou Marcel	Sermeillet 12 150 Sévérac Le Château	200 Ad et 50Ag	10/12/2007	05/02/2008
GAEC de Longuelouve	Les Monziols	60 Ad TV	mi janvier 08	
	Zone de Sévérac	350vAd et 125 Ag	15/12/2007	01/02/2008
GAEC des Mazes	Les Mazes 30 750 Lanuéjols Zone du Causse Noir	550 Ad et 196 Ag	10/01/08 puis retours mi avril 08	10/02/2008
EARL Castanier	La Blaquièrre 12 520 Verrières Zone de Sévérac	260 Ad et 106 Ag	début octobre 07 et février 08	
GAEC du Bousquet	Le Bousquet	180 Ad et 30 Ag TV	20/07/2007	
	12 150 Sévérac Le Château	347 Ad et 130 Ag TL	05/02/2008	10 et 17/03/08
GAEC de Aubépine	48 500 St-Rome-de-Dolun	140 Ad et 48 Ag	25/06/2007 troupeau Fédou lait	
	Zone de Sévérac	350 Ad et 150 Ag	25/01/2008 troupeau Roquefort	fév-mars 2008
EARL de Sermeillet	Sermeillets 12 150 Sévérac Le Château	750 Ad et 250 Ag	15/01/2008	10/02/2008
SCEA de Sauvebiau	Zone de Millau	264 Ad et 83 Ag	début janvier 08	mi février 08

TL : Troupeau de brebis Laitières

Ag : Agnelles, c'est-à-dire brebis primipares

TV : Troupeau de brebis Viandes

MB : Mises Bas

Ad : Brebis adultes, c'est-à-dire multipares

Tableau 1 : Présentation des élevages enquêtés : adresse et composition des cheptels avec dates prévues des mises bas sur les adultes et les agnelles.

Sept élevages sont localisés dans la zone de Sévérac-Le-Château (12, France) et seulement deux autres se situent hors de cette zone. Ces élevages n'ont aucun lien entre eux et il n'y a jamais eu d'échanges d'animaux entre eux.

II. Etablissement de l'enquête

Un des objectifs de l'enquête était d'identifier ou du moins établir des hypothèses sur l'origine des avortements apparus pendant la saison de mises bas 2007-2008 et lors des saisons de mises bas précédentes quand les données recueillies le permettaient. On espère ainsi obtenir une estimation du niveau de contamination des élevages en chlamyphilose, fièvre Q et toxoplasmose ces dernières années. Le second intérêt de l'enquête est de contrôler l'observance des protocoles de vaccination contre la chlamyphilose mis en place dans ces élevages. Le dernier objectif de cette enquête est de dégager des facteurs de risque d'avortements par rapport à la conduite d'élevage autour de la vaccination et des mises bas.

La première partie de l'enquête porte sur la constitution du troupeau, la conduite de la reproduction en 2007 et les résultats obtenus, la conduite des agnelles du sevrage à la mise à la lutte et les introductions d'animaux pour le renouvellement du cheptel. L'épidémiologie, le nombre relatif d'avortements dans le troupeau par rapport à l'ensemble des mises bas de 2007-2008 ainsi que la description clinique de ces avortements sont abordés en second lieu. Les étapes de la mise en place du chantier de vaccination sont détaillées de l'achat du vaccin à la vaccination du lot concerné. Une attention particulière est ensuite portée à la description du schéma de vaccination contre la chlamyphilose avec un vaccin vivant depuis sa première année d'utilisation. On souhaite ainsi définir le pourcentage et la nature des animaux couverts par la vaccination en 2007 et le nombre d'années de vaccination sans coupure pour y parvenir. Quatrièmement, on recherche des facteurs de perturbation de la mise en place de la réponse immunitaire post vaccinale comme cela peut être le cas lors de vaccination d'animaux malades ou sous traitement médical (antibiotiques auxquels les *Chlamyphila* sont sensibles), ou encore lors de stress des animaux par un changement alimentaire ou de conduite du troupeau. Une cinquième partie traite des moyens de prévention de l'infection des animaux et des avortements par un traitement antibiotique préventif en fin de gestation, par les

pratiques concernant l'hygiène des locaux et enfin par la conduite des éleveurs lors des mises bas.

Une autre partie de l'enquête concerne les troubles de reproduction (taux d'agnelles et de brebis non gravides, ayant avorté et ayant mis bas des agneaux morts dans les 48h), ainsi que les analyses effectuées en conséquence pour le diagnostic de la chlamydiafilose, de la fièvre Q et de la toxoplasmose depuis l'agnelage d'hiver 2002-2003.

J'ai pu compléter les données obtenues lors d'un entretien avec chaque éleveur avec les informations recueillies lors des visites d'élevage effectuées les années précédentes en fin de période d'agnelage et archivées par le Dr. Lepeticolin et le Dr. Patout, vétérinaires à l'AVEM (Association de Vétérinaires et Eleveurs du Millavois). J'ai ainsi pu établir un état des lieux le plus complet possible autour de la problématique des avortements pour les neuf élevages enquêtés.

III. Lien entre les avortements constatés ces dernières années dans les neuf élevages et la chlamydiafilose

L'enquête auprès des éleveurs et l'analyse des dossiers des neuf élevages m'ont permis d'établir un bilan des données liées à la reproduction. Les résultats obtenus lors des agnelages suivant la mise en place d'un protocole de vaccination des animaux contre la chlamydiafilose avec un vaccin vivant et l'inventaire des années où la chlamydiafilose, la fièvre Q et la toxoplasmose ont été diagnostiquées comme causes probables d'avortement sont présentés dans le tableau 2.

Nom de l'élevage	Troupeau	Bilan reproduction							Année début utilisation vaccin vivant contre la chlamydiafilose	Dates diagnostic causes avortements			
			% mortinatalité Ad	% avortements Ad	% non gravides Ad	% mortinatalité Ag	% avortements Ag	% non gravides Ag		chlamydiafilose	fièvre Q	toxoplasmose	
		objectifs	< 5	< 3	< 5	< 5	< 3	< 5					
1	GAEC du Moulin	TL	moyenne	0,47	2,44	11,65	0	3,11	5,63	2000	jan-96, nov-06, nov-07, jan-08		
			écart-type	0,5	1,84	10,26	0	5,39	0,85				
	TV	moyenne	1	5,45	13,75		0,42	16	2003	août-05, mai-06	août-05		
			écart-type	7,75	11,67		0,93	8,49					
2	Cabirou Marcel	TL	?							2003	déc-05, janv-06	jan-06, mar-06	Jan-06, nov-06
3	GAEC de Longuelouve	TL	moyenne	4,39	4,95	12,15	3	2,31	11,43	2001	jan-01, jan-07	avr-07	janv-01
			écart-type	1,66	3,77	6,38		3,26	0,8				
	TV	moyenne		15,18	29,09				2001	août-00		août-00	
			écart-type	4,25									
4	GAEC des Mazes	TL	moyenne	3,99	2,96	13,97	5,48	3,08	9,85	2003	Jan-05, déc-05, jan-08	janv-07	janv-03
		écart-type	1,68	1,84	6,72	3,71	0,42	1,52					
5	EARL Castanier	TL	moyenne	11,2	2,22	6,38	10,02	5,17	17,13	1996	jan-02, jan-06, jan-07	jan-02, jan-06, jan-07	jan-03, jan-05
		écart-type	4,24	1,97	2,7	7,9	5,11	9					
6	GAEC du Bousquet	TL	moyenne	8,16	1,89	6,7	12,8	3,62	6,19	1999	déc-99, déc-00, jan-02, jan-03, jan-06	janv-07	nov-99, déc-00
		écart-type	3,48	1,01	3,81	7,56	2,09	4,56					
7	GAEC de Aubépine	TRoq	moyenne	5,5	5,08	18,69	6,13	4,42	20,22	1997	jan-02, mars-05, mars-06	jan-02, mar-05, fév-07	janv-95
			écart-type	3,73	3,2	10,54	3,07	2,11	14,56				
	TFéd	moyenne	13,61	1,91	7,84	12,84	2,81	33,09	1997	juin-06			
			écart-type	13,58	1,18	4,36	13,51	2,03					27,5
8	EARL de Sermeillet	TL	moyenne	6,83	1,09	5,72	6,64	2,79	19,67	1998	déc-01-jan-02, jan-03, jan-04, nov-05, jan-07		fév-98, jan-03, déc-04
		écart-type	6,12	1,55	2,75	5,74	3,32	13,36					
9	SCEA de Sauvebiau	TL	moyenne	3,14	1,03	2,13	4,8	1,76	9,9	1998	nov-00, déc-05, déc-07	janv-06	
		écart-type	2,52	1,12	1,17	6,01	1,93	6,31					

TL : Troupeau de brebis Laitières

TV : Troupeau de brebis Viandes

TRoq : Troupeau trait pour la laiterie Roquefort

TFéd : Troupeau trait pour la laiterie Fédou

Ad : Brebis adultes, c'est-à-dire multipares

Ag : Agnelles, c'est-à-dire brebis primipares

Tableau 2 : Récapitulatif des résultats moyens de reproduction des neuf élevages depuis la mise en place d'un protocole de vaccination contre la chlamydiafilose avec un vaccin vivant, liste des années où des avortements ont été imputés à la chlamydiafilose, à la fièvre Q et à la toxoplasmose.

Une des principales difficultés rencontrées dans l'établissement de ce bilan fut le recueil des données liées à la reproduction des années précédant 2007-2008. Les résultats obtenus sont de ce fait incomplets ou partiellement erronés mais donnent une idée de l'historique des élevages. L'ensemble de ces élevages a commencé à utiliser un vaccin vivant contre la chlamydiafilose suite à un épisode d'avortement (élevages 3, 6 et 7), suite à une fertilité anormalement basse sur le lot des agnelles par rapport aux années précédentes (4) ou suite à un important problème d'infertilité, d'avortement et de mortinatalité combinés (5 et 8). Le bilan des résultats de reproduction donnés dans le tableau 2 montre que ceux-ci peuvent paraître insuffisants. L'objectif fixé par la coopérative UNICOR est d'obtenir moins de 5% de mortinatalité, moins de 3% d'avortements et moins de 5% de brebis non gravides. La sonnette d'alarme est tirée dès que ces résultats dépassent respectivement 10%, 5% et 10. Ce bilan cache cependant de grandes disparités entre les élevages et entre les différentes périodes d'agnelage. Certains élevages ont des problèmes récurrents d'hypofertilité (4, 5, 7, 8) ou de mortinatalité (5) et la vaccination des animaux ne semble pas contribuer à une amélioration de ces résultats. Des problèmes ponctuels d'avortements ont été constatés dans les élevages 2, 3 et 5 lors des mises bas des agnelles (2 et 5) ou des adultes (3 et 5) pendant deux années consécutives (5) ou lors de deux agnelages espacés de deux ans (2 et 3). Des problèmes ponctuels d'hypofertilité (7 TFéd et 9) ou de mortinatalité (6 et 7 TFéd) ont aussi été constatés certaines années sur le lot des agnelles. Une partie de ces mauvais résultats de reproduction a été imputée à une circulation de *C. abortus* dans les neuf élevages. En effet, les résultats de laboratoires des recherches directes ou indirectes de *C. abortus* à partir de prélèvements de mucus vaginaux ou de sérums de brebis ayant avorté se sont avérés positifs une ou plusieurs années après le début de la vaccination du troupeau contre la chlamydiafilose avec un vaccin vivant (voir tableau 2 : les sérologies non interprétables ne sont pas mentionnées).

Néanmoins, l'analyse des dossiers des élevages a montré que les problèmes de reproduction rencontrés ces dernières années ont de nombreuses autres causes. En ce qui concerne les causes d'avortement d'origine infectieuse, la fièvre Q et/ou la toxoplasmose ont parfois été incriminées dans tous les élevages (voir tableau 2)! Une intoxication au coumestrol après ingestion de foin de luzerne moisi a été fortement suspectée au Gaec de Longuelouve, ce qui pourrait expliquer l'hypofertilité et l'hypoprolificité constatées sur le lot des agnelles en 2006-2007. Il en fut de même au Gaec de Sauvebiau en 2000 et 2005. Des taux de brebis non gravides trop élevés peuvent être expliqués dans certains doubles troupeaux (4, 7) par un délai trop court entre la mise bas et la mise à la lutte quand elles sont transférées d'un troupeau à l'autre. Un nombre insuffisant de béliers pour la lutte ou une

surexploitation de ceux-ci peut se traduire par une baisse du taux de fécondation des brebis (3, 4, 8). L'absence ou la mise en place d'un flushing alimentaire inadapté autour de la lutte contribuent aussi à détériorer le taux de fécondité des brebis (4, 7, 8). Une absence de supplémentation en minéraux de la ration des brebis en fin de gestation peut contribuer à la mise bas d'agneaux morts nés (6).

Il apparaît donc que la chlamyphilose n'est certainement pas la seule responsable de tous les maux touchant les paramètres de reproduction dans ces neuf élevages. Il n'en reste pas moins que *C. abortus* est encore identifiée dans des cas d'avortements ou de mise bas de morts nés, et ce malgré la mise en place d'un protocole de vaccination avec un vaccin vivant, parfois depuis plus de 10 ans !

IV. Analyse des schémas de vaccination de ces élevages

La mise en place d'un protocole vaccinal contre la chlamyphilose avec utilisation d'un vaccin vivant fut généralement motivée par des épisodes abortifs ou par des taux de brebis non gravides élevés. En général, les brebis étaient auparavant vaccinées un mois avant la lutte ou/et en fin de gestation avec un vaccin inactivé.

a) Le protocole de vaccination

La première année, seules les agnelles (1, 2), les agnelles et les antenaises (4, 6, 7, 8, 9), ou l'ensemble du cheptel étaient vaccinés (3, 5). Dans les deux premiers cas, il fallait alors s'attendre à ce que l'assainissement du troupeau soit plus long. Les années suivantes, seules les agnelles de renouvellement étaient vaccinées, d'abord à 6 mois (soit un mois avant la lutte) puis de plus en plus tôt, vers 4-5 mois (3, 4, 6, 8, 9). Il est arrivé que des classes d'âge aient été vaccinées assez tardivement dans les troupeaux mettant bas en été (1 : classes des 3000 et 5000 TV). Des rappels sont parfois effectués sur l'ensemble ou la partie la plus âgée du troupeau (1 : classes des 3000 et antérieures en 2005 TV, 4000 et antérieures en 2007 TL, 4 : classe des 1000 et antérieures en 2007, 7 : ensembles du troupeau en 2000). Cependant, ces « rappels » ont aussi été effectués sur des brebis très âgées qui n'avaient pas reçu de primo vaccination étant agnelles car le protocole de vaccination avec un vaccin vivant n'avait pas

encore été mis en place. Elles ne peuvent alors en aucun cas être considérées comme protégées par la vaccination.

La vaccination des béliers n'était pas comprise dans le protocole de vaccination contre la chlamydiafilose. Or, même si leur rôle dans l'apparition d'avortements semble être mineur, ils peuvent être à l'origine d'hypofertilité. Les mâles infectés par *C. abortus* peuvent souffrir d'orchite et d'épididymite après une phase de chlamydiaémie (Rodolakis et al., 1998, Aitken, 2000, Nietfeld, 2001). Un bélier souffrant d'une orchite au Gaec de Longuelouve et ayant sailli le lot des agnelles avait d'ailleurs été signalé en 2007. La qualité du sperme de ces béliers est altérée et ils deviennent stériles (Storz, 1976, Rodolakis et Bernard, 1977).

b) Respect de ce protocole

Les vaccins sont transportés sous froid (paquet isotherme et pains de glace) de la coopérative à l'élevage en moins de 30min. Ils sont alors mis au réfrigérateur jusqu'au chantier de vaccination (<48h). Le nombre de doses achetées correspond au nombre d'animaux à vacciner et il n'y a pas conservation de vaccins d'une année sur l'autre. Le chantier de vaccination est effectué par l'éleveur lui-même, immédiatement après reconstitution du vaccin. L'injection de 2 mL de vaccin se fait par voie sous-cutanée ou intramusculaire au niveau du plat des côtes ou de l'encolure. S'il arrive que l'aiguille traverse la peau de part en part et que le vaccin est injecté dans la toison, l'animal est revacciné.

Les éleveurs ont adhéré au protocole décrit ci-dessus depuis 5 à 12 ans (voir tableau 2). L'analyse de l'historique des vaccinations des neuf élevages a montré qu'il y avait eu des oublis de vaccination des agnelles certaines années (1 : classes des 1000 et 3000, 6 : classe des 000, 8 : classes des 1000, 2000 et 4000). Certaines classes d'âge avaient été « rattrapées » l'année suivante, c'est-à-dire vaccinées après une première saison de reproduction au cours de laquelle elles auraient pu s'infecter au contact de brebis adultes avortées et excrétrices (1 : classe des 1000, 6).

La vaccination seule ne permet pas d'éradiquer la chlamydiafilose et doit obligatoirement être associée aux mesures d'hygiène de base et à une conduite d'élevage adéquate autour de la mise bas.

V. Pratiques d'élevage contribuant à la pérennisation d'une infection par *C. abortus* dans les élevages

a) Facteurs de risque d'introduction de *C. abortus*

Le renouvellement du troupeau, l'amélioration génétique de celui-ci ou la réorientation du type de production font appel à des introductions d'agnelles et de brebis adultes (3, 4, 5, 7, 8) ou de béliers (2, 3, 4, 6, 8, 9). Or le statut infectieux de ces animaux à l'introduction et celui de leur élevage d'origine n'est pas connu. L'introduction d'animaux infectés latents par *C. abortus* dans un cheptel peut présenter un risque de contamination des brebis (Chalmers et al, 1976, Chalmers et al., 1997, Aitken, 2000, Bouakane et al., 2005, Milne et al., 2008). L'introduction de brebis contaminées aux Gaecs de Longuelouve et d'Aubépine a causé un épisode abortif dans leurs troupeaux dans les deux années qui ont suivi, ce qui a motivé la mise en place du protocole de vaccination des agnelles. Ces animaux introduits ne sont malheureusement pas systématiquement mis en quarantaine et la chlamydophilose n'est pas dépistée. De plus, les brebis introduites ne sont pas toujours vaccinées !

Dans les cas de doubles troupeaux, une pratique courante consiste à transférer les brebis non gravides ou ayant avorté du troupeau mettant bas en hiver vers le troupeau mettant bas en été pour leur donner « une seconde chance » de produire un agneau dans l'année (1, 4, 6, 7). Cependant, si ces brebis sont infectées par *C. abortus*, et en particulier si elles ont avorté, on risque ainsi de déplacer le problème d'un troupeau à l'autre (Milne et al., 2008)!

b) Facteurs de risque de diffusion de *C. abortus*

- Diffusion dans le troupeau

Le parcage des parturientes dans des boxes individuels pendant un à deux jours favorise l'adoption des agneaux par leur mère biologique ou adoptive et contribue à limiter la transmission de *C. abortus* entre brebis ayant avorté et brebis saines. Les placentas ou les agneaux morts, sources potentielles importantes de *C. abortus*, ne sont pas systématiquement ramassés et détruits (1, 2, 3, 5, 7) et sont même parfois donnés aux chiens (3, 5, 7). Or le niveau de contamination moyen d'un placenta de brebis ayant avorté a été estimé à $6,7.10^5$

corps élémentaires par gramme de cotylédon infecté (Johnson et al., 1983). Une étude plus récente a même conclu à une contamination placentaire moyenne de $2,7.10^7$ bactéries par microgramme de cotylédon infecté (Livingstone et al., 2008). Des placentas contaminés peuvent souiller la litière et une brebis placée dans une boxe à la suite d'une brebis ayant avorté peut s'infecter si la litière n'a pas été changée, ce qui est souvent le cas (Aitken, 2000).

Une brebis qui avorte suite à une infection par *C. abortus* continuera d'excréter des bactéries pendant plusieurs semaines dans les sécrétions utérines, les fèces, le lait et l'urine (Becerra, 1976, Papp et al., 1996, Nietfeld, 2001, Ongör, 2004). Le fait de ne pas séparer les brebis ayant avorté du reste du lot et de les garder dans l'un ou l'autre troupeau de l'exploitation contribue à la diffusion de *C. abortus* au sein du cheptel (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8).

- Transmission aux agnelles de renouvellement

Une brebis infectée peut transmettre la chlamydophilose à ses agneaux *in utero*. Les agnelles, nées de brebis ayant avorté et conservées pour le renouvellement du troupeau, sont enclines à avorter à leur tour lors de leurs premières saisons de reproduction (Wilsmore et al., 1990, Chalmers et al., 1997, Aitken, 2000, Nietfeld, 2001, Philips et Clarkson, 2002, Milne et al., 2008). Il arrive que des brebis ayant avorté adoptent de futures agnelles de renouvellement ce qui présente un risque de transmission de *C. abortus* à ces agnelles par établissement d'un contact étroit (3, 4, 5, 6, 7). L'analyse des généalogies des brebis a permis de montrer l'existence de nombreux cas où des brebis ayant avorté ou ayant mis bas des agneaux morts dans les premières 48h auraient transmis la chlamydophilose à leurs « filles » qui ont avorté à leur tour (1, 4, 6, 7). Cependant, malgré le fait que nous nous situions dans un contexte épidémiologique d'infection latente des troupeaux par la chlamydophilose, il n'y a pas eu de diagnostic d'avortement individuel sur toutes ces brebis pour nous permettre de confirmer cette hypothèse.

En ce qui concerne les troupeaux laitiers, les agnelles sont sevrées à un mois et séparées physiquement des adultes ce qui limite leur temps de contact avec des brebis infectées.

VI. Proposition de mesures visant à contribuer à l'assainissement des cheptels

a) Mesures prophylactiques

Le traitement de tous les animaux d'un lot par une injection intramusculaire d'oxy-tétracyclines à longue action à raison de 7 à 8 mg/kg dès l'apparition de 3 à 5 avortements successifs limite l'apparition d'avortements en fin de gestation mais ne constitue pas une mesure prophylactique puisqu'il ne s'agit que d'un bactériostatique. Ce traitement ne permet pas d'empêcher l'excrétion vaginale de *C. abortus* à la mise bas par les brebis infectées et ne contribue donc pas à assainir le troupeau (Rodolakis et al., 1980, Greig, 1982, Miller et al., 1990, Aitken, 2000, Entrican et al., 2001, Nietfeld, 2001, Rekiki et al., 2003).

L'utilisation d'antibiotiques doit être raisonnée et réservée à des cas d'urgence (Aitken, 2000). Elle ne doit pas être systématisée pour ne pas risquer de faire apparaître des résistances.

L'observance du schéma de vaccination prescrit par les vétérinaires est impérative. Des oublis de vaccination certaines années exposent des classes d'âge d'agnelles entières au risque d'infection lié à la présence de brebis excrétrices au moment des mises bas.

Si des animaux doivent être achetés pour le renouvellement, ils doivent provenir de cheptels indemnes ou doivent au moins avoir été vaccinés correctement (Aitken, 2000, Entrican et al., 2001).

Il serait souhaitable de vacciner les béliers dans la mesure où le risque de transmission vénérienne de *C. abortus* n'est pas exclu. *C. abortus* a pu être isolée à partir de prélèvements d'organes génitaux de béliers cliniquement atteints, ou de sperme, de liquide séminal et d'urine de béliers infectés expérimentalement (Storz, 1976, Rodolakis et Bernard, 1977, Appleyard et al., 1985). La mise à la lutte avec des béliers infectés peut causer chez la femelle des vaginites et des endométrites ne permettant pas une bonne implantation des embryons (Appleyard et al., 1985). L'infection vaginale de brebis pendant l'oestrus peut s'étendre au placenta et conduire à la naissance d'agneaux chétifs infectés (Appleyard et al., 1985, Papp et Shewen, 1996, Aitken, 2000). Des brebis ayant avorté seraient susceptibles d'excréter *C. abortus* dans le mucus vaginal autour des oestrus suivants mais en de très faibles quantités (Papp et al., 1994 et 1998, Aitken, 2000, Livingstone et al., 2008). Les béliers pourraient

donc s'infecter lors de la lutte, mais cette hypothèse reste controversée. Par contre, il n'est pas exclu que des béliers infectés *in utero* ou par voie oro-nasale puissent jouer un rôle de vecteurs dans la transmission de la maladie aux brebis. Les béliers doivent donc être vaccinés au même titre que les agnelles, d'autant plus que cela ne présente pas, à mon avis, un surcoût ou une charge de travail excessifs.

Les anticorps colostraux dirigés contre *C. abortus* persistent chez les agneaux de brebis infectées pendant six semaines (Wilsmore et al., 1984). La vaccination des agnelles doit donc être effectuée dès 3 mois d'âge, pour limiter leur risque d'infection au contact des adultes avortées et excrétrices, tout en ayant dépassé la période de couverture par l'immunité colostrale. Néanmoins, il faut retenir que la vaccination d'agnelles infectées *in utero* ne sera pas protectrice. L'existence d'agnelles infectées à un très jeune âge a pu être mise en évidence par le Dr. Lepeticolin qui a procédé à l'écouvillonnage vaginal de 34 agnelles de 4 mois nées en 2008 au Gaec des Mazes. Les mucus vaginaux de deux d'entre elles se sont avérés positifs en *C. abortus* par PCR en temps réel (Karine Laroucau, AFSSA). La mère de l'une d'entre elles avait avorté en 2006-2007 et avait participé à un pool de mucus vaginaux fortement positif vis-à-vis de *C. abortus* en PCR en temps réel. Il apparaît alors que la vaccination du cheptel est essentielle pour limiter l'infection des agnelles mais elle doit obligatoirement être associée à des mesures de bonne conduite d'élevage.

b) Conduite à tenir en période d'agnelage

Les brebis prêtes à mettre bas doivent être mises en cages individuelles et les brebis ayant avorté doivent être réformées ou au minimum isolées du reste du troupeau pendant trois semaines (Papp et al., 1996, Plommet, 1997, Aitken, 2000, Entrican et al., 2001, Milne et al., 2008). En principe, ces brebis n'avortent pas une seconde fois mais il semblerait qu'elles puissent ensuite donner naissance à des agnelles infectées (Wilsmore et al., 1990, Nietfeld, 2001, Philips et Clarkson, 2002). L'idéal serait de réformer immédiatement toute brebis avortée et sa progéniture mais ces mesures ne sont pas applicables sur le terrain pour des raisons aussi bien économiques que logistiques.

Au cas où l'éleveur souhaite conserver ces brebis sur le long terme, il est fortement déconseillé de les transférer dans un autre lot dont la conduite de la reproduction est décalée dans le temps (Nietfeld, 2001). On risque alors de contaminer ce lot, par excrétion de *C. abortus* par les brebis ayant avorté ou notées non gravides, voire par voie vénérienne par l'intermédiaire des béliers (généralement lutte naturelle pour les lots « annexes »).

Les placentas et les avortons ou agneaux morts nés doivent être ramassés et détruits par incinération ou envoyés à l'équarrissage (Aitken, 2000, Milne et al., 2008). Ils ne doivent pas être laissés à disposition des carnivores domestiques, des nuisibles ou des vautours car ces derniers peuvent constituer un réservoir et jouer le rôle de vecteurs passifs dans la transmission de *C. abortus* aux brebis (Sayada et al., 1995, Berri et al., 2004).

Les recommandations usuelles en matière d'entretien des bâtiments, de renouvellement et de traitement des litières doivent être respectées pour éliminer les bactéries présentes dans le milieu extérieur. Les corps élémentaires peuvent conserver leur pouvoir infectieux pendant des jours dans l'environnement, voire des mois à très basse température (Nietfeld, 2001). Les boxes d'agnelage doivent donc être curés, désinfectés et repaillés après chaque passage de brebis parturiente (Aitken, 2000). *C. abortus* est inactivé en une à trente minutes par la plupart des désinfectants, alcools, l'éther, le chlore, l'iode, les dérivés de permanganate, le formol, les acides et les bases (Storz, 1971, Aitken, 2000).

On rappelle que la chlamydophilose est une zoonose (Johnson et al., 1985, Wong et al., 1985). Les femmes enceintes doivent éviter d'intervenir sur les agnelages dans des troupeaux infectés et les autres membres du personnel doivent se protéger les mains et les avant bras avec des gants et laver et désinfecter leurs vêtements après intervention ou utiliser des tenues à usage unique (Nietfeld, 2001).

VII. Conclusions relatives à cette enquête

L'élevage ovin est un système complexe dans lequel différents agents pathogènes et facteurs d'élevages interfèrent simultanément. Une étude approfondie menée sur neuf élevages ovins du bassin de Roquefort présentant un problème d'avortement malgré la mise en place d'un protocole de vaccination depuis plusieurs années contre la chlamydophilose Abortive Ovine m'a fait me rendre compte de cette complexité et de la difficulté de répondre à une problématique d'avortements. L'identification de *C. abortus* dans des cas d'avortements ou de mise bas d'agneaux morts nés dans des élevages vaccinés contre la chlamydophilose avec un vaccin vivant est troublante. Il existe toujours une circulation de *C. abortus* dans ces élevages mais elle n'explique pas à elle seule tous les cas d'avortements et tous les résultats de reproduction insatisfaisant constatés.

La persistance d'avortements dus à *C. abortus* dans ces élevages pourrait en partie être expliquée par le non respect de certaines règles en matière de vaccination ou de conduite du troupeau autour de l'agnelage. Il serait cependant trop simple de jeter la pierre aux éleveurs, surtout lorsque l'on retrouve cette problématique dans des élevages à très haut niveau technique. La transmission verticale de la chlamydiaose entraîne la naissance d'agnelles infectées de façon latente et contribue à la pérennisation de la maladie dans le troupeau. Ce problème majeur pourrait être résolu à l'avenir si un test diagnostique suffisamment fiable, automatisable et à moindre coût était développé et commercialisé pour détecter les animaux infectés latents dans le but de les éliminer du troupeau (Milne et al., 2008).

Une seconde hypothèse pour tenter d'expliquer l'isolement de *C. abortus* dans des élevages qui vaccinent les agnelles parfois depuis plus de dix ans avec un vaccin vivant serait l'apparition d'une souche *C. abortus* hyper virulente ou contre laquelle le vaccin vivant thermosensible 1B protégerait moins bien. Bien que *C. abortus* forme une espèce très homogène, des variations antigéniques des protéines de la membrane externe (MOMP : major outer membrane protein) ont été découvertes sur les trois souches POS, LLG et AB 16. Ces protéines pourraient jouer un rôle dans l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. L'efficacité du vaccin vivant thermosensible 1B vis-à-vis de ces souches atypiques a pourtant été démontrée expérimentalement (Bouakane et al., 2005). Des écouvillons vaginaux ont été effectués sur des brebis ayant avorté ou ayant mis bas des morts nés lors de l'agnelage de l'hiver 2007-2008 dans le but d'isoler et multiplier des souches *C. abortus* locales. Une expérimentation sur modèle murin a ensuite été menée à l'INRA de Nouzilly pour tester l'efficacité du vaccin vivant atténué 1B sur la ou les souches isolées.

Partie 3: Etude expérimentale visant à isoler des souches *C. abortus* locales dans le but tester l'efficacité du vaccin vivant thermosensible 1B à partir d'un modèle murin.

Matériels et méthodes

C. abortus est une bactérie de niveau de risque pour la santé humaine du groupe 2 (décret n° 94-352 du 4 mai 1994, Lherm, 1999). La manipulation de souches *C. abortus* est donc effectuée dans un laboratoire de confinement L2 sous une hotte de sécurité microbiologique de Classe I (annexe I de l'article 3 de l'arrêté ministériel du 13 août 1996, OIE, 2005b). Les expérimentations sur des souris infectées par *C. abortus* sont effectuées dans des animaleries de confinement A2 (annexe I de l'article 2 de l'arrêté du 19 avril 1988).

I. Prélèvement de *C. abortus* chez les brebis présentant des signes cliniques compatibles avec la chlamyphilose

L'écouvillon vaginal est un prélèvement de choix pour isoler *C. abortus*. Il donne une idée de la contamination bactérienne moyenne du placenta lorsqu'il est prélevé au moment de l'avortement ou de la mise bas (Souriau et Rodolakis, 1986) et permet de limiter les contaminations extérieures, comme c'est souvent le cas lors du prélèvement de cotylédons si le placenta a touché le sol (Rekiki, 2004). Ce type de prélèvement est simple, rapide et peut être effectué dans tous les cas de figure. En effet, il n'est pas nécessaire d'avoir accès au placenta (qui peut être ingéré par la brebis après la mise bas) et on peut effectuer un prélèvement sur une brebis ayant mis bas des agneaux chétifs mais vivants (impossibilité de prélever des organes).

L'objectif était de pouvoir effectuer deux prélèvements sur des brebis ayant avorté ou mis bas des agneaux morts nés le jour même, dans les élevages où la chlamyphilose persistait malgré la vaccination du troupeau. La probabilité de détecter *C. abortus* dans le vagin est maximale si le prélèvement est effectué dans les 24h après l'avortement (OIE, 2005a). Dans ce but, nous avons demandé aux éleveurs concernés de nous appeler dès qu'un avortement se produisait pour que nous nous déplaçons pour faire le prélèvement. Dans le cas où nous n'étions pas disponibles, les éleveurs qui avaient été fournis préalablement en écouvillons vaginaux effectuaient eux-mêmes les prélèvements. Les écouvillons vaginaux ont été effectués avant toute intervention thérapeutique pour ne pas risquer d'obtenir de faux

négatifs dus à une réponse aux antibiotiques. Le protocole de prise et de conservation des échantillons de mucus vaginaux est présenté en annexe 2.

Dans un contexte d'avortements dus à *C. abortus*, un seul prélèvement pour isolement à l'INRA nous paraissait suffisant. On suppose que les deux écouvillons contenaient une charge équivalente en bactéries.

II. Isolement et multiplication des *C. abortus*

La partie expérimentale a été réalisée à l'INRA de Nouzilly en appliquant les méthodes et procédures habituelles au laboratoire dirigé par Mme Rodolakis.

On effectue une mise en culture des *Chlamydomphila* présentes sur les écouvillons vaginaux des brebis ayant avorté sur cellules McCoy, dans le but de les isoler par la technique des plages de lyse (Rodolakis et Chancerelle, 1977, Rodolakis, 1983, Rodolakis et al., 1989, Berri et al., 2004). Le protocole de mise en culture cellulaire des *Chlamydomphila* et la technique des plages de lyse sont détaillées en annexe 3. Cette technique d'isolement bactérien, sensible et reproductible, présente l'avantage de cloner les souches et de pouvoir quantifier les *Chlamydomphila* présentes dans le prélèvement de départ (Rodolakis et Chancerelle, 1977).

La culture des *Chlamydomphila* sur œufs embryonnés est effectuée à partir des plages obtenues sur cellules McCoy et des mucus vaginaux correspondants dans le but de multiplier les bactéries (Annexe 4). *C. abortus* est inoculée dans la vésicule vitelline de l'embryon de l'œuf et se multiplie dans les cellules des vaisseaux de la membrane vitelline. A la mort de l'embryon, l'œuf est autopsié et on récupère la membrane vitelline riche en bactéries. Cette membrane est broyée puis centrifugée et le surnageant de centrifugation est aliquoté dans des cryotubes conservés à -75°C. (Rodolakis, 1976a, Rodolakis et Souriau, 1997)

Quelques dizaines de microlitres de surnageant sont conservés à 4°C pour vérifier la présence de *C. abortus* par PCR.

III. Caractérisation de l'espèce des *Chlamydophila* isolées

Après extraction de l'ADN cible, on amplifie une partie de celui-ci par PCR (Polymerase Chain Reaction) dans le but de détecter et d'identifier les souches *Chlamydophila* isolées par culture cellulaire et sur œuf embryonné (Denamur et al., 1991, Sayada et al., 1994 et 1995, Meijer et al., 1997, Everett et Andersen, 1999). On déterminera l'espèce d'une souche isolée par l'étude du profil de restriction du produit amplifié par PCR (Denamur et al., 1991). (Annexe 5)

IV. Utilisation d'un modèle murin pour l'étude de l'efficacité du vaccin Cevac *Chlamydia*ND sur des souches *C. abortus*

L'efficacité du vaccin contre la chlamydiafilose est estimée en comparant le nombre moyen de souriceaux vivants par portée de souris vaccinées et inoculées deux mois plus tard par une souche virulente à celui d'un lot de souris témoins inoculées mais non vaccinées (Rodolakis et al., 1981, Buzoni-gatel et Rodolakis, 1983, Rodolakis, 1983, Rekiki et al., 2003, Berri et al., 2004). La probabilité que les moyennes de souriceaux vivants sept jours après la mise bas de deux lots de souris soient égales est calculée à l'aide du test T de Student, avec une distribution bilatérale (Rodolakis et al., 1981, Rodolakis, 1983).

L'inoculation intrapéritonéale de la souris gravide avec *C. abortus* provoque une colonisation placentaire et fœtale entraînant la mort de toute ou partie de la portée en fonction de la quantité de bactéries inoculées (Rodolakis, 1976a, 1976b, 1983, Buzoni-gatel et Rodolakis, 1983, Caro et al., 2008). Les symptômes observés chez la souris après inoculation d'une souche *C. abortus* virulente pendant la gestation sont identiques à ceux observés chez la brebis infectée en conditions naturelles : l'inoculation à mi-gestation (10 ± 1 jours) permet d'obtenir un maximum d'avortements, de mise bas de petits morts nés et apparemment normaux dans une même portée, ou de naissance de petits infectés latents asymptomatiques ou mourant dans leur première semaine de vie. Une inoculation plus précoce entraîne des mortalités embryonnaires difficiles à distinguer d'une absence de fécondation, et une inoculation plus tardive diminue le risque de mortinatalité (Rodolakis, 1976a et 1981, Buzoni-

gatel et Rodolakis, 1983, Rekiki et al., 2003). Les variations interindividuelles observées en réponse à une inoculation donnée dépendent de la souche (Bouakane et al., 2003), de la dose infectante et de la sensibilité de l'hôte (Rodolakis, 1976a, 1976b et 1981, Rodolakis et al., 1989).

La première étape de l'étude a donc consisté à déterminer pour la souche isolée AB 22 la dose de bactéries à inoculer pour provoquer la mort d'environ 80% des souriceaux, ce qui est suffisant pour mettre en évidence l'activité du vaccin avec seulement 10 à 15 souris par lot, sans être excessif et risquer de submerger les défenses immunitaires de la souris et masquer l'efficacité du vaccin (Rodolakis et al., 1981).

a) Détermination de la dose abortive de *C. abortus*

Pour cela, 130 souris de lignée OF1 SPF ont été mises avec des mâles (3 souris par mâle) pendant trois jours. A mi-gestation et après pesée, les souris ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 0,2 mL de *C. abortus* à différentes concentrations (Tabl. 3).

Lot	Dose/souris	Souche	Membrane	Dilution	Nombre de souris gravides
1	10 ⁴	AB 22	15 297	1/2000	11
2	10 ⁵	AB 22	15 297	1/200	10
3	10 ⁶	AB 22	15 297	1/20	14
4	10 ⁴	AB 7	10 410	1/2000	9
5	10 ⁵	AB 7	10 410	1/200	10
6	10 ⁶	AB 7	10 410	1/20	10
7	Témoin de gestation				7

Tableau 3 : Composition des lots de souris gravides inoculées avec différents de dilution des souches de *C. abortus* AB 22 et AB 7.

Après inoculation, les souris ont été placées en cages individuelles. Elles ont ensuite été pesées quotidiennement pour suivre la gestation et observer les avortements ou déterminer la survie des souriceaux.

b) Détermination de l'efficacité du vaccin vivant Cevac ChlamydiaND

Suite à une erreur de manipulation, toutes les souris vaccinées et témoins non vaccinées ont été mélangées après leur mise à la reproduction. Des prélèvements de sang furent effectués sur les 92 souris les plus lourdes (présumées gravides) pour effectuer un titrage d'anticorps pour repérer les souris vaccinées, et constituer les cinq lots décrits dans le tableau 4.

Lot	Vaccin	Souche	Membrane	Dilution	Nombre de souris gravides
1	+	AB22	15 297	1/20	16
2	-	AB22	15 297	1/20	16
3	+	AB7	10 410	1/40	11
4	-	AB7	10 410	1/40	15
5	Témoin de gestation				34

Tableau 4 : Composition des lots de souris gravides, préalablement vaccinées ou pas, et inoculées avec les souches AB 22 et AB 7.

Un second prélèvement de sang fut réalisé après la mise bas pour confirmer la vaccination ou non des souris. En effet une augmentation notable du titre en anticorps quatorze jours après inoculation ne peut être observée que sur les souris ayant des cellules immunitaires mémoires.

Les protocoles de vaccination et d'inoculation des souris par *C. abortus* sont détaillés en annexe 6.

V. Dosage des anticorps par ELISA

Le titre en anticorps anti-*Chlamydomphila* des souris vaccinées est déterminé à l'aide du kit de diagnostic rapide ChekitTM Chlamydia (D. Bommeli, IDEXX laboratories, Liebefeld-Bern, Suisse). Ce kit fut développé pour détecter les anticorps anti-*Chlamydomphila* présents dans le sérum des ruminants infectés. L'évaluation expérimentale de ce test a montré qu'il existait des réactions croisées avec des souches *C. pecorum* ovines (Vretou et al., 2007,

Wilson et al., 2008). Contrairement aux ruminants, les souris ne sont pas porteuses de *C. pecorum*. Ce manque de spécificité n'a donc pas d'incidence sur l'interprétation des résultats obtenus.

Le conjugué du kit a dû être modifié pour l'adapter à la reconnaissance d'anticorps d'origine murine, et les sérum témoins ont du être remplacés par des sérums murins (voir détails en annexe 7).

Résultats

I. Descriptif des écouvillons vaginaux obtenus

Des écouvillons vaginaux ont été effectués sur des brebis appartenant à huit des neuf élevages concernés par l'étude (aucun au Gaec de Longuelouve). Les brebis écouvillonnées ont avorté ou mis bas des agneaux morts nés entre quatre mois de gestation et la date prévue du terme. Au total, 27 brebis ayant présenté des signes cliniques compatibles avec une infection par *C. abortus* ont pu être écouvillonnées (Tabl. 5).

Elevage	Date avortement	Date de prélèvement	N° des brebis prélevées	Nature du prélèvement analysé à Scanelis	Résultat PCR Scanelis	Envoi écouvillon INRA
M. Cabirou	22/11/07	29/11/07	3029 et 4026	pool mucus vaginaux	N	3029 non mais 4026 oui
EARL Castanier	13/12/07	13/12/07	7110	individuel	N	oui
GAEC de l'Aubépine	24/12/07	24/12/07	6269	individuel	P < 200	oui
	31/12/07	31/12/07	6073	individuel	P 1,65.10⁵	oui
GAEC de Sauvebiau	20/12/07	20/12/07	3009	individuel	P < 200	oui
			3035	individuel	P 6,55.10⁴	oui
GAEC du Moulin	07/11/207	07/11/07	9028 et 5013	pool mucus vaginaux	P 4,96.10⁴	9028 et 5013 oui
	09/11/07	09/11/07	5064	aucun prélèvement envoyé		oui
		09/11/07	2030	aucun prélèvement envoyé		oui
	10/11/07	09/11/07	4030	aucun prélèvement envoyé		oui
		10/11/07	3015	aucun prélèvement envoyé		oui
	11/11/07	11/11/07	5050	aucun prélèvement envoyé		oui
	22/12/07	22/12/07	7064	aucun prélèvement envoyé		oui
03/01/08	03/01/08	7058 et 7015	pool mucus vaginaux	P 7,9.10⁴	7058 non mais 7015 oui	
GAEC des Mazes	08/12/07	11/12/07	5084	individuel	N	oui
	07 et 10/01/08	10/01/08	5086, 4118, 3122, 5083	pool mucus vaginaux	P 2,35.10⁵	oui tous
		11/01/08	5017 et 2113	pool mucus vaginaux	P < 200	oui tous
GAEC du Bousquet	05/01/08	05/01/08	3070	individuel	N	oui
EARL de Sermeillet	09 et 10/01/08	10/01/08	1083 et 9067	pool mucus vaginaux	P < 200	oui tous

P : résultat PCR positif

N : résultat PCR négatif

N° surlignés : brebis dont les écouvillons n'ont pas subi de rupture de la chaîne du froid.

Tableau 5: Identité des brebis écouvillonnées pour envoi d'un échantillon à l'INRA et résultats d'analyse PCR en temps réel des écouvillons envoyés au laboratoire Scanelis pour diagnostic direct d'avortement à *C. abortus*.

Cette étape de prise d'échantillons de mucus vaginaux n'a pas toujours pu être effectuée en suivant le protocole à la lettre, bien que la coopération des éleveurs et la disponibilité des vétérinaires aient été entières.

Malgré la campagne d'information effectuée auprès des éleveurs avant la mise en œuvre du protocole, plusieurs brebis ayant avorté au Gaec du Moulin n'ont fait l'objet que d'un seul prélèvement de mucus vaginal. Ces prélèvements ont donc été conservés pour être envoyés directement à l'INRA, sans diagnostic préalable de chlamyphilose abortive ovine. Dans un contexte d'infection avérée du troupeau par la chlamyphilose, démontrée par l'historique des avortements dans l'élevage et la positivité en PCR des pools de mucus vaginaux des brebis écouvillonnées en 2007-2008, ces échantillons étaient bien susceptibles de contenir *C. abortus*.

Les éleveurs étant débordés en période d'agnelage, un certain nombre de prélèvements ont été effectués trop tardivement. C'est le cas pour les brebis 3029 et 4026 de M. Cabirou (prélevées 7 jours après avortement), pour les brebis 5053 et 5054 de la SCEA Sauvebiau (6 jours) et pour la brebis 5084 du GAEC des Mazes (3 jours). Les résultats d'analyses effectués au laboratoire Scanelis pour les brebis 3029, 4026 et 5084 sont peut-être faussement négatifs (Tabl. 5).

Au final, les résultats des analyses PCR en temps réel effectuées au laboratoire Scanelis à partir de pools de mucus vaginaux ou à partir de prélèvements individuels ne sont avérés être fortement positifs pour des brebis n'appartenant qu'à quatre élevages : les Gaecs de l'Aubépine, de Sauvebiau, du Moulin et des Mazes.

Nous avons dû faire face à plusieurs problèmes techniques qui auraient pu diminuer nos chances d'isoler *C. abortus* vivantes à partir de ces écouvillons vaginaux.

En cas d'incapacité de déplacement pour effectuer les prélèvements, les éleveurs les ont fait eux-mêmes et ont conservé les écouvillons vaginaux au réfrigérateur ou au congélateur à -20°C (écouvillons des brebis 5050 et 7064 du Gaec du moulin). Or la congélation des prélèvements à -20°C altère fortement la viabilité des *Chlamydiae* (Prentice et Farrant, 1977). D'autre part, l'isolement de *Chlamydiae* après conservation à 4°C pendant

plus de quatre jours n'est possible que si la concentration de départ en bactéries est très élevée (Reeve et al., 1975).

Lors de la période de Noël 2007, une évaporation totale de l'azote liquide du réservoir cryogénique dans lequel les écouvillons vaginaux étaient conservés a entraîné une rupture de la chaîne du froid pendant 24 à 48h. Les numéros des brebis surlignés dans le tableau 5 correspondent aux brebis dont les écouvillons ont été placés dans la cuve après cet incident technique.

Lors du dépôt des tubes contenant les écouvillons vaginaux dans l'azote liquide ou lors de leur retrait du réservoir cryogénique pour les conditionner dans le colis envoyé à l'INRA, plusieurs tubes en verre ou leurs bouchons se sont fendus. L'azote liquide s'était sans doute infiltré dans les tubes en verre, ce qui a donné lieu à une surpression qui a provoqué l'éclatement des tubes. Compte tenu du risque élevé de contamination extérieure des échantillons, ces derniers n'ont pas été utilisés (écouvillons des brebis 3029, 7058...).

II. Choix des écouvillons vaginaux pour l'inoculation des cultures cellulaires

Le choix des écouvillons vaginaux utilisés pour la mise en culture cellulaire de *C. abortus* s'est porté dans un premier temps sur ceux des brebis dont les écouvillons vaginaux envoyés au laboratoire Scanelis s'étaient avérés fortement positifs en PCR (individuelles ou en pool de mucus vaginaux). Les prélèvements effectués sur des brebis appartenant à des élevages où les avortements n'ont pas été diagnostiqués avec certitude comme étant dus à la chlamydiafilose ont été exclus du protocole expérimental. Les écouvillons vaginaux des brebis des quatre élevages restant (Gaecs de l'Aubépine, de Sauvebiau, du Moulin et des Mazes) qui ont été placés dans le réservoir d'azote liquide après la rupture de froid et qui n'avaient pas été préalablement congelés à -20°C chez les éleveurs ont ensuite été sélectionnés. Enfin, quatre écouvillons de brebis du Gaec du Moulin qui n'avaient pas fait l'objet de recherche individuelle de cause d'avortement et deux écouvillons de brebis du Gaec des Mazes dont les résultats PCR étaient douteux ont été sélectionnés car ces brebis présentaient des problèmes à la mise bas dans un contexte avéré d'avortements enzootique. Le détail des écouvillons sélectionnés pour l'inoculation des cultures cellulaires est présenté dans le tableau 6.

Elevage	N° brebis écouvillonnées	Résultat PCR Scanelis	ap/av rupture N liq
Gaec Aubépine	6073	1,65.10 ⁵	ap
Gaec Sauvebiau	3035	6,55.10 ⁴	av
Gaec du Moulin	9028 et 5013	4,96.10 ⁴	av
	5064, 2030, 4030	non testé	av
	3015	non testé	av
	7058 et 7015	7,9.10 ⁴	ap
Gaec des Mazes	5086, 4118, 3122, 5083	2,35. 10 ⁵	ap
	5017 et 2113	< 200	ap

Tableau 6: Brebis dont les écouvillons ont été choisis pour inoculer les cultures cellulaires.

« av rupture N liq » correspond aux écouvillons qui étaient conservés dans le réservoir cryogénique d’azote liquide avant la période de Noël et qui ont donc subi une rupture du froid et « ap rupture N liq » correspond aux écouvillons qui ont été placés dans le réservoir cryogénique après cet événement.

III. Isolement de *Chlamydomphila* sur culture cellulaire à partir des écouvillons vaginaux

Une ou deux plages de lyse ont été obtenues sur les tapis cellulaires des cupules inoculées avec le mucus vaginal de brebis provenant de trois élevages : les Gaecs du Moulin, des Mazes et d’Aubépine (Tabl. 7). Les trois souches *C. abortus* sont baptisées AB 21 pour le GAEC du Moulin, AB 22 pour le GAEC des Mazes et AB 23 pour le GAEC Aubépine. A correspond à « Avortement » et B correspond à « Brebis ». Le chiffre 21 indique que c’est la 21^{ème} souche d’avortement ovin isolée à l’INRA de Nouzilly, et ainsi de suite.

Les rares plages de lyses observées ne l’ont été que sur les cupules de cellules inoculées à partir de cultures pures ou diluées au dixième. Ces résultats sont décevants puisque l’on s’attendait à obtenir au moins dix à vingt plages de lyse par cupule compte tenu du niveau de contamination présumé des écouvillons vaginaux. De plus, les plages de lyse

obtenues correspondent bien à des cellules mortes (vérification à la loupe binoculaire) mais leurs délimitations ne sont pas franches.

Eleveage	N° brebis écouvillée	Degré dilution	Nbe plages de lyse	Concentration
Moulin	4030	10 ⁻¹	1	50 Chl/mL
	9028	pure	1	5 Chl/mL
		10 ⁻¹	1	50 Chl/mL
	7015	pure	1	5 Chl/mL
Mazes	4118	pure	1	5 Chl/mL
	5086	pure	2	10 Chl/mL
	5083	pure	1	5 Chl/mL
		10 ⁻¹	2	100 Chl/mL
Aubépine	6073	pure	1	5 Chl/mL
		10 ⁻¹	1	50 Chl/mL

Tableau 7 : Résultats du comptage des plages de lyses obtenues après inoculation des cultures cellulaires par les surnageants d'essorage des écouvillons vaginaux et leurs dilutions.

La concentration présumée en *Chlamydomphila* dans le produit d'essorage des écouvillons vaginaux ne s'élèverait qu'à 5-100 UFP/mL. Ces résultats signifient que, soit les prélèvements de départ étaient particulièrement pauvres en bactéries, soit leur conservation a altéré la survie des *Chlamydomphila*, soit les cultures cellulaires ont subi des dommages ne permettant pas une bonne multiplication des bactéries.

IV. Isolement de *C. abortus* par culture sur œufs embryonnés

a) Succès de l'isolement de la souche AB 22

Trois passages sur œufs embryonnés ont été réalisés pour tenter de multiplier *C. abortus* à partir des plages de lyses ou d'isoler une souche en inoculant le mucus vaginal dans les œufs embryonnés. Les détails des résultats de ces trois cultures sur œufs embryonnés sont présentés dans les annexes 8, 9 et 10.

Les plages de lyse ont permis d'obtenir trois cultures faiblement positives (15 228, 15 248 et 15 251) à partir de deux plages de lyse correspondant aux prélèvements des brebis 4030 et 7015 du GAEC du Moulin, et une culture bien positive à partir d'une plage de lyse correspondant au prélèvement de la brebis 4118 du GAEC des Mazes (15 232). Ces souches AB 21 et AB 22 ont aussi été obtenues sur les embryons directement inoculés par les mucus vaginaux des brebis 4030 (culture 15 172) et 4118 (culture 15 183). (Fig. 1 et Annexe 8)

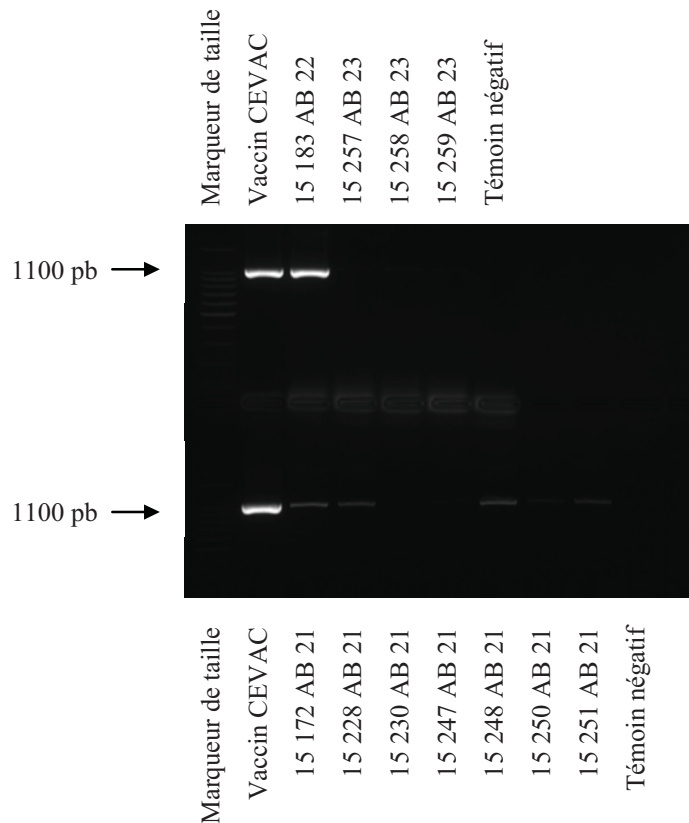


Figure 1 : Amplification par PCR d'une fraction du gène *ompA* de la culture 15 183 de la souche AB 22 et des cultures 15 172, 15 228, 15 248 et 15 251 de la souche AB 21.

Comme c'est souvent le cas, plusieurs écouvillons vaginaux prélevés dans les trois élevages étaient trop contaminés pour permettre la culture sur œuf, même en utilisant des antibiotiques. Tous les œufs inoculés à partir des mucus vaginaux des brebis 6073 du GAEC de l'Aubépine et à partir des mucus vaginaux des brebis 7015 et 9028 du GAEC de Moulin ont dus être éliminés à cause de contaminations bactériennes, de même que ceux qui ont été inoculés avec les plages de lyse obtenues à partir de l'écouvillon de la brebis 9028 (Annexe 8). De plus, un seul des œufs inoculés à partir des mucus vaginaux des brebis 5083 et 5086 du GAEC des Mazes n'était apparemment pas contaminé. Cette contamination bactérienne a pu

être mise en évidence par la présence de colonies sur les géloses au sang de mouton ensemencées à partir des membranes. De multiples colonies de faible diamètre à croissance rapide (formation en moins de 12h) étaient observées. La couleur verdâtre des colonies faisait penser à une hémolyse de type α . L'examen microscopique de ces colonies a permis de conclure qu'il s'agissait de coques Gram + mobiles disposés en courtes chaînettes. Ces coques sont catalases négatives. Elles résistent à la gentamycine. L'ensemble de ces critères pousse à conclure à une contamination par des bactéries du genre *Streptococcus* ou *Enterococcus*. Les *Streptococcus* sont souvent présents sur les muqueuses et les *Enterococcus* font partie de la flore intestinale et résistent bien dans l'environnement.

La contamination bactérienne a également été retrouvée lors du deuxième passage réalisé à partir de la culture 15 172 faiblement positive (Fig. 1) de la souche AB 21 obtenue en broyant ensemble deux œufs inoculés avec le mucus vaginal de la brebis 4030 du GAEC du Moulin (Annexe 9). Il faut noter que deux des cinq œufs inoculés avec la plage de lyse correspondant à la brebis 4030 étaient contaminés et trois des huit œufs inoculés avec le mucus vaginal correspondant avaient été éliminés (Annexe 8). Lors du troisième passage sur œuf, toutes les cultures étaient contaminées ou négatives en PCR (Annexe 10). La souche AB 21 n'a donc pas pu être isolée.

Le premier passage sur œuf a néanmoins permis d'isoler la souche AB 22 sur l'œuf 15 183 à partir du mucus vaginal de la brebis 4118 du GAEC des Mazes (Fig. 1 et Annexe 8). Au second passage, toutes les cultures étaient bien positives en PCR (Fig. 2 et Annexe 9).

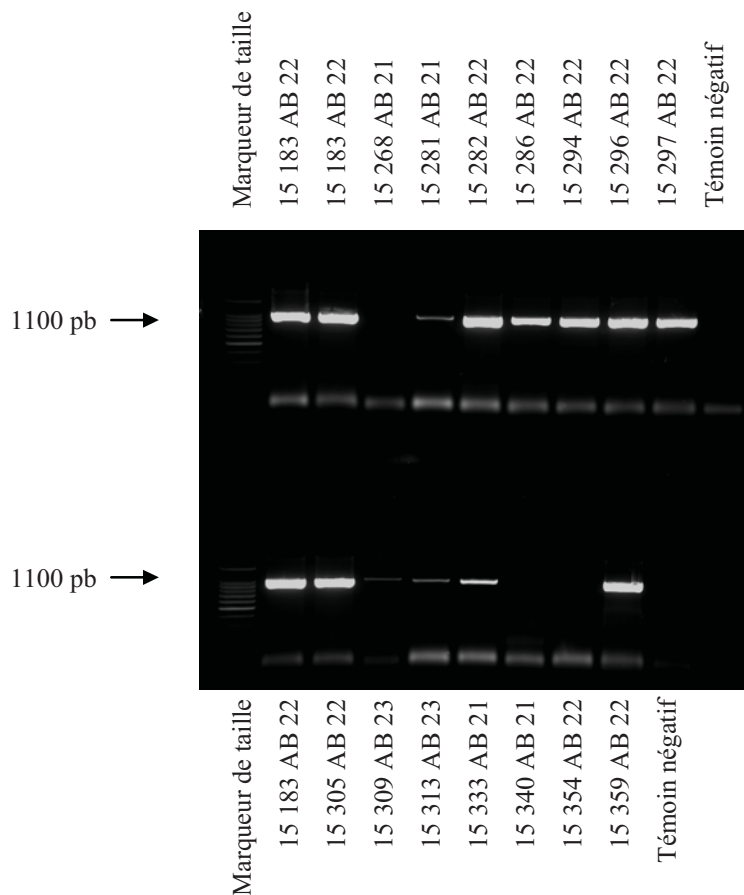


Figure 2 : Amplification par PCR d'une fraction du gène *ompA* des cultures 15 183, 15 282, 15 286, 15 294, 15 296, 15 297, 15 305 et 15 359 de la souche AB 22 et de la culture 15 333 de la souche AB 21.

La souche AB 23 du GAEC de l'Aubépine n'a pas pu être isolée, bien que des cultures aient entraîné une très faible positivité en PCR (15 309, 15 313 et 15 315) lors du second passage sur œuf réalisé à partir de la plage de lyse obtenue avec l'écouvillon vaginal de la brebis 6073 (Annexe 9). Les cultures du troisième passage sur œuf étaient contaminées ou négatives en PCR (Annexe 10).

b) Caractérisation RFLP de la souche AB 22

Seule la présence de la souche *C. abortus* AB 22 a pu être mise en évidence par PCR dans les broyats des différentes cultures sur œufs embryonnés en amplifiant l'espace intergénique 16S-23S (Fig. 3) et le gène *ompA* codant la protéine majeure de la membrane externe (Fig. 4). Les souches entre parenthèses sont extérieures à l'étude.

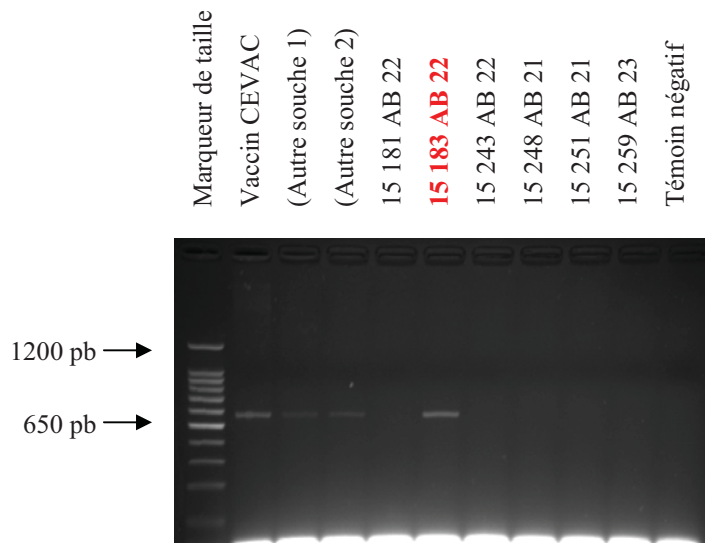


Figure 3 : Amplification par PCR de l'espace intergénique 16S-23S de la culture 15 183 de la souche AB 22.

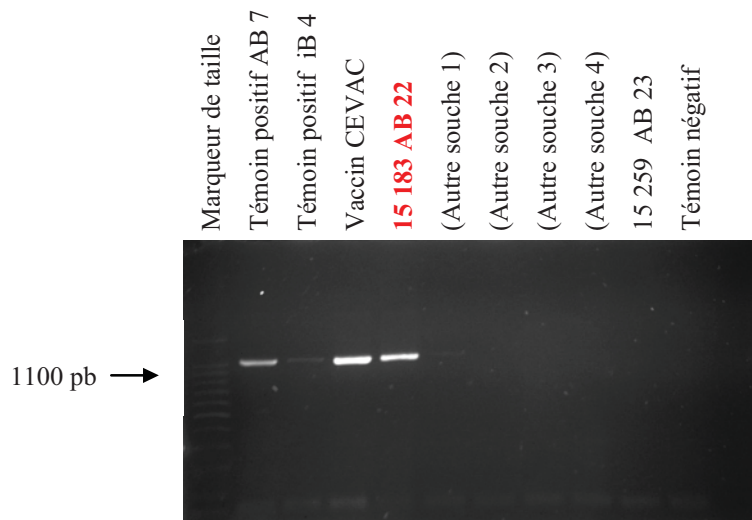


Figure 4 : Amplification par PCR d'une fraction du gène *ompA* de la culture 15 183 de la souche AB 22.

La taille des fragments d'ADN amplifiés est la même que celle des témoins constitués par la souche vaccinale 1B, *C. abortus* AB7 et *C. pecorum* iB4 : 1100 pb pour le gène *ompA* (Denamur et al., 1991, Sayada et al., 1994 et 1995) et comprise entre 600 et 700 pb pour l'espace intergénique 16S-23S.

Pour caractériser l'espèce de la souche isolée il est indispensable de faire une PCR-RFLP. Elle a été réalisée sur les produits d'amplification du gène *ompA*.

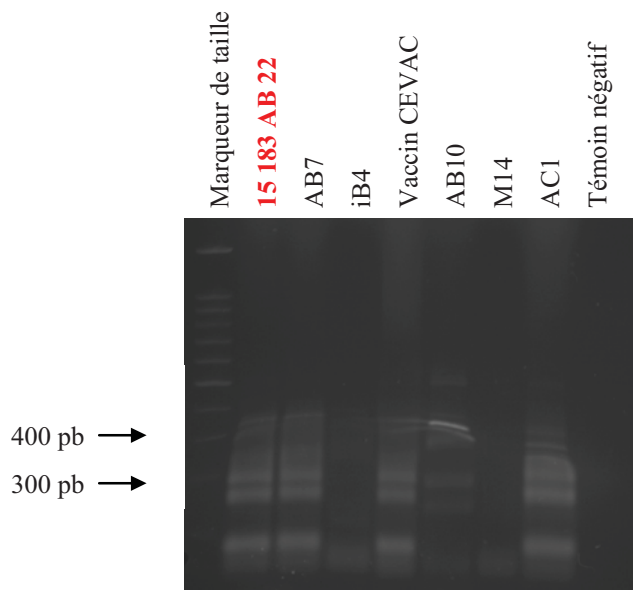


Figure 5 : Profil de restriction du gène *ompA* de la culture 15 183 de la souche AB 22 amplifié par PCR et digéré par l'enzyme de restriction *Alu I*.

Bien que la qualité de l'électrophorèse soit médiocre, on voit nettement que le profil de restriction de la souche AB 22, est le même que celui des souches *C. abortus* AB7 et la souche vaccinale 1B. Ils sont différents des profils des souches *C. pecorum* iB4, AB10 et M14. On peut donc conclure que la souche AB 22 isolée appartient à l'espèce *abortus*.

c) Détermination de la concentration des cultures en *Chlamydomphila*

- Par la technique des plages de lyse

La concentration en *Chlamydomphila* dans les surnageants des membranes vitellines du premier passage sur œufs est estimée par la technique des plages de lyse (Tabl. 8).

Culture	Nombre de plages de lyses en fonction du degré de dilution des surnageants					Concentration
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
15 183 AB 22	Mort cellules	Mort cellules	Indénombrable	Indénombrable	66 et 52	3.10 ⁷ UFP/mL
15 232 AB 22	Mort cellules	Mort cellules	Mort cellules	Indénombrable	84 et 75	4.10 ⁷ UFP/mL
15 172 AB 21	-	-	-	-	-	0
15 248 AB 21	-	-	-	-	-	0
15 259 AB 23	-	-	-	-	-	0
15 243 AB 22	-	-	-	-	-	0

Tableau 8: Estimation de la concentration en *Chlamydomphila* dans les surnageants des membranes vitellines des œufs 15 183, 15 232, 15 172, 15 248, 15 259 et 15 243 par la méthode des plages de lyses.

Les cultures 15 183 et 15 232 étaient tellement riches en bactéries qu'elles ont entraîné la lyse du tapis cellulaire jusqu'aux dilutions respectives de l'inoculum au 1/100^{ème} et au 1/1000^{ème}. Le nombre de plages de lyses obtenues aux dilutions 1/1000^{ème} et 1/10 000^{ème} était trop élevé pour pouvoir être comptabilisé à la loupe binoculaire. Le dénombrement des plages de lyses obtenues avec la dilution des surnageants au 1/100 000^{ème} permet de conclure que la concentration en *Chlamydomphila* de ces surnageants s'élève à 3.10⁷ UFP/mL pour la culture 15 183 et à 4.10⁷ UFP/mL pour la culture 15 232.

- Par PCR

Le titrage par plage de lyse des cultures 15 183 et 15 232 de la souche AB 22 a servi à étalonner le titrage PCR réalisé par dilution de l'ADN (Fig. 6).

Comme on utilise 50 µL de surnageant de membrane vitelline pour extraire l'ADN dans un volume final de 150 µL de tampon AE, on peut considérer que la concentration en ADN du produit d'extraction d'ADN de la culture 15 183 s'élève à 10⁴ unités d'ADN/µL comme l'atteste bien l'amplification de l'ADN jusqu'à la dilution 1/10 000^{ème}.

Par transposition de ce schéma, on estime que la concentration en *Chlamydomphila* dans les surnageants des membranes des œufs 15 172, 15 251 et 15 228 est de l'ordre de 10⁵ bactéries/mL, celle du surnageant de la membrane 15 248 est estimée à 10⁴ bactéries/mL et celle du surnageant de la membrane 10 410 à 10⁸ bactéries/mL. La présence de la souche AB 21 est confirmée mais sa mise en culture sur œufs n'a pas permis de la multiplier autant que la souche AB 22.

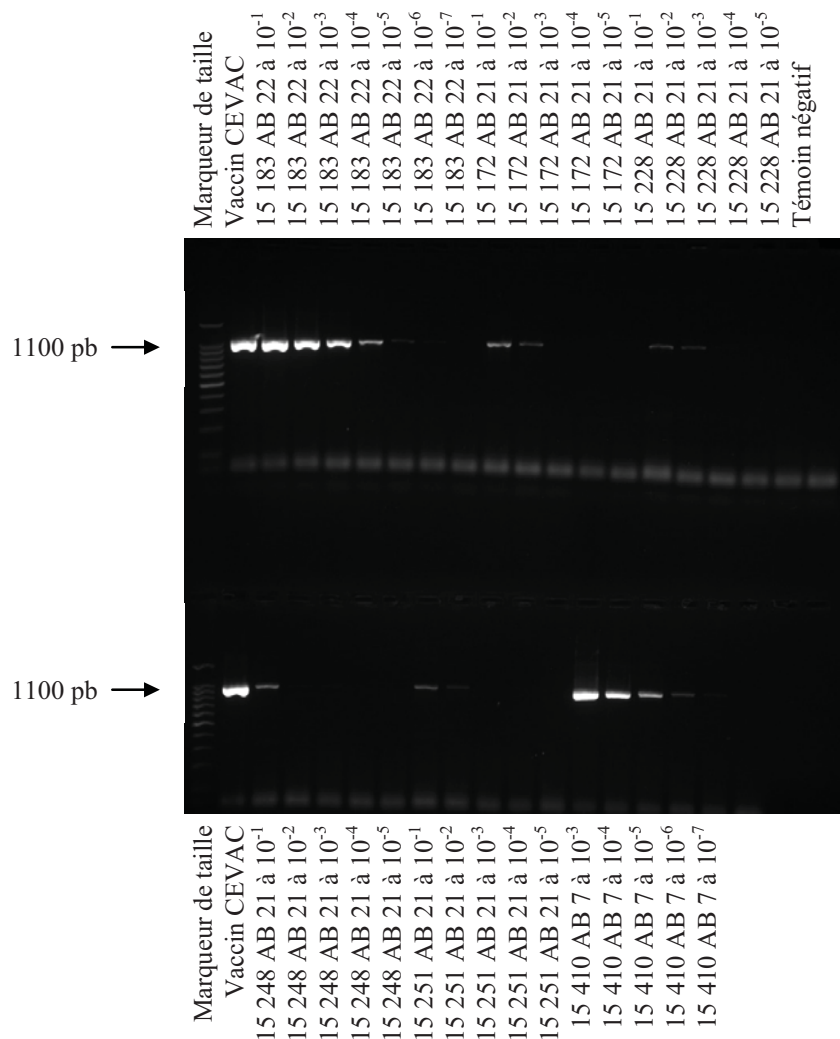


Figure 6 : Estimation par PCR (en diluant l'ADN) de la concentration en *Chlamydia* de la culture 15 183 de la souche AB 22, des cultures 15 172, 15 228, 15 248 et 15 251 de la souche AB 21 et de la culture 15 410 de la souche AB 7.

Après trois passages sur œufs, seule la souche *C. abortus* AB 22 a pu être réellement isolée et suffisamment multipliée pour permettre une étude de l'efficacité du vaccin dans un modèle murin. La culture 15 297 de cette souche fut sélectionnée pour inoculer les souris car sa concentration en *Chlamydia* était estimée à 10^8 bactéries/mL. L'isolement des souches AB 21 et AB 23 aurait nécessité des cultures supplémentaires qui n'étaient pas envisageables dans le temps imparti pour la thèse.

V. Détermination de la dose abortive de *C. abortus* pour les souris

Par convention, on parle d'avortement quand tous les souriceaux d'une portée sont morts à la mise bas (Buzoni-Gatel et Rodolakis, 1983).

Quelque soit le lot de souris, la plupart des mises bas ont eu lieu autour du 11^{ème} ou 12^{ème} jour suivant l'épreuve infectante, soit près du terme.

Souche	Lot	Nbe souris gravides par lot	Nbe souris mortes	Nbe souris ayant avorté	Nbe médian souriceaux vivants à 7j
AB 22	1	11	1	0	6
	2	10	0	0	7,5
	3	14	1	5	0
AB 7	4	9	0	1	5
	5	10	1	2	2
	6	10	7	3	0
Témoins de gestation		7	0	0	12

Tableau 9: Effets de l'inoculation de souris gravides par les souches *C. abortus* AB 22 et AB 7 sur la suite de leur gestation.

Les souches AB 22 et AB 7 causent des avortements, de la mortalité chez les souris et diminuent la prolificité moyenne des souris, comme c'est le cas chez les brebis atteintes de chlamyphilose (Tabl. 9). L'inoculation de souris gravides par ces deux souches entraîne la naissance de souriceaux chétifs mourant au cours de leur première semaine de vie. L'impact de l'infection des souris par *C. abortus* est proportionnel à la dose infectante.

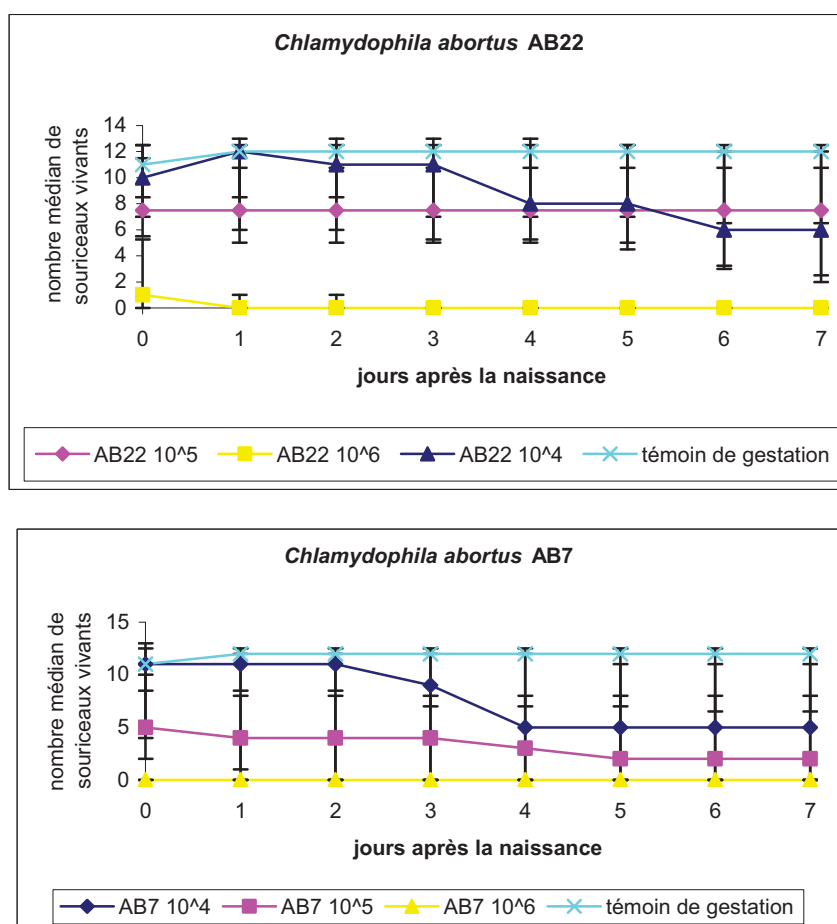


Figure 7 : Nombre médian de souriceaux vivants par portée après une inoculation intrapéritonéale de souris à 10 ± 1 jours de gestation par trois doses de *C. abortus* AB 7 et AB 22.

Le nombre médian de souriceaux vivants dans les portées des souris inoculées par les souches AB 22 et AB 7 à la dose 10^6 bactéries/souris est quasiment nul. L'évolution du nombre médian de souriceaux vivants dans la semaine suivant la mise bas des souris inoculées par les souches AB 22 et AB 7 aux doses 10^5 bactéries/souris et 10^4 bactéries/souris montre une augmentation de la mortalité des souriceaux après 2-3 jours. L'infection des souris par *C. abortus* entraîne donc la naissance de souriceaux chétifs et non viables sur le long terme, comme on l'observe chez les brebis. (Fig. 7)

La souche AB 22 à la dose 10^6 bactéries/souris a été à l'origine de nombreux avortements et n'a entraîné la mort que d'une souris. L'inoculation des souris avec la souche AB 7 à la dose 10^5 bactéries/souris n'entraîne pas suffisamment de mortalité mais la dose 10^6 bactéries/souris est trop forte puisqu'elle a causé la mort de sept souris sur dix. (Tabl. 9 et Fig. 7)

Nous avons donc décidé de diluer la culture 15 297 de la souche AB 22 au 1/10^{ème} et de diluer la culture 10 410 de la souche AB 7 au 1/40^{ème} pour l'inoculation des souris vaccinées deux mois avant épreuve.

VI. Efficacité du vaccin vivant Cevac ChlamydiaND vis-à-vis de la souche AB 22

Le test ELISA effectué avant l'inoculation permet de distinguer très nettement deux groupes de souris (Tabl. 10).

		Lot des souris témoins de la virulence de la souche AB 22														
n° souris	77	79	86	90	93	95	98	101	103	104	109	113	114	124	126	133
titre Ac 1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
titre Ac 2	15	18	10	19				8	17	19		26	10	14	11	21

		Lot des souris témoins de l'efficacité du vaccin 1B contre la souche AB 22														
n° souris	6	20	22	23	25	26	27	28	29	30	33	37	70	81	119	137
titre Ac 1	117	12	42	46	70	67	57	92	97	85		115	58	29	22	52
titre Ac 2	198	80	102	67	57	146	189	127	205	111	126	103	70	107	104	166

		Lot des souris témoins de la virulence de la souche AB 7														
n° souris	48	53	54	61	71	80	91	97	106	110	115	120	122	127	128	
titre Ac 1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
titre Ac 2	10	8	21	16			17	40	1		23	25	8	10	20	

		Lot des souris témoins de l'efficacité du vaccin 1B contre la souche AB 7									
n° souris	4	8	31	32	112	116	118	125	130	131	135
titre Ac 1	45	34	40	59	97	35	85	82	36	53	56
titre Ac 2	122	119	108	125	189	137	154	153	134	70	88

Interprétation des couleurs de remplissage des tableaux :

Titre négatif	Titre positif +	Titre positif ++	Titre positif +++
---------------	-----------------	------------------	-------------------

Tableau 10: Titres en anticorps anti-*C. abortus* des sérums des souris prélevées à 10 ± 1 jours de gestation (titre Ac 1) et autour des mises bas (titre Ac 2).

Les souris présentant des titres en anticorps nuls à 10 ± 1 jours de gestation ont été considérées comme non vaccinées et les souris présentant des titres en anticorps > 10 ont été considérées comme étant vaccinées (Tabl. 10).

Cette hypothèse a été confirmée par les résultats des sérologies ELISA effectuées sur ces souris au moment des mises bas (Tabl. 10). En effet, toutes les souris supposées initialement comme étant non vaccinées, et qui ont été classées dans les lots témoins de virulence des souches AB 22 et AB 7, présentent des titres en anticorps < 40 , et $< 20,5$ pour 75% d'entre elles. D'autre part, les souris supposées vaccinées présentent après inoculation des taux d'anticorps plus élevés qu'à mi-gestation et $> 102,5$ pour 75% d'entre elles.

Les souris du lot témoin de la virulence de la souche AB 22 sont soit toutes mortes, soit ont avorté à partir du neuvième jour post-inoculation. La mise bas des souris des autres lots s'est produite autour du treizième jour post inoculation. (Tabl. 11)

Lot	Nbe souris gravides	Nbe souris mortes	Nbe souris ayant avorté	Nbe médian souriceaux vivants à 7j
Témoins virulence AB 22	16	4	13	0
Témoins efficacité vaccin contre AB 22	16	1	4	8
Témoins virulence AB 7	15	1	1	12
Témoins efficacité vaccin contre AB 7	11	0	0	9
Témoins de gestation	34	0	0	11

Tableau 11: Effets de l'inoculation de souris vaccinées ou non vaccinées à $10 \pm$ jours de gestation par les souches AB 22 et AB 7.

La dose infectante de la souche AB 22 était plus élevée que nous l'avions espéré puisque son effet est plus fort que lors de l'expérience précédente, pour une concentration d'inoculum supposée être identique. Les résultats obtenus dans le lot de souris témoins de la virulence de la souche AB 7 sont au contraire meilleurs que ceux obtenus précédemment dans le lot des souris inoculées avec cette souche diluée au $1/200^{\text{ème}}$. Les écarts d'effets de virulence des deux souches observés entre les deux expériences peuvent être expliqués par une mauvaise homogénéisation de la suspension au moment de la distribution de la souche AB 22 dans les tubes entraînant d'importantes variations de concentration en bactéries entre les aliquotes d'un même surnageant de membrane vitelline. En ce qui concerne la souche AB

7, des pannes de congélateur à -80° survenues l'été précédent peuvent avoir entraîné une baisse du titre des aliquotes variable selon leur place dans le congélateur. (Tabl. 9 et 11)

Aucune souris du lot témoin de l'efficacité du vaccin Cevac ChlamydiaND contre la souche AB 7 n'est morte ni n'a avorté. Par contre, quatre souris ont avorté dans le lot témoin de l'efficacité du vaccin Cevac ChlamydiaND contre la souche AB 22, dont une suite à une mise bas dystocique. Ces derniers résultats doivent être relativisés car les effets de l'infection du lot de souris non vaccinées par la souche AB 22 ont été beaucoup trop forts (Tabl. 11). La dose infectante en *C. abortus* AB 22 utilisée dans ce cas est bien plus élevée que la dose infectante relative des brebis en conditions naturelles.

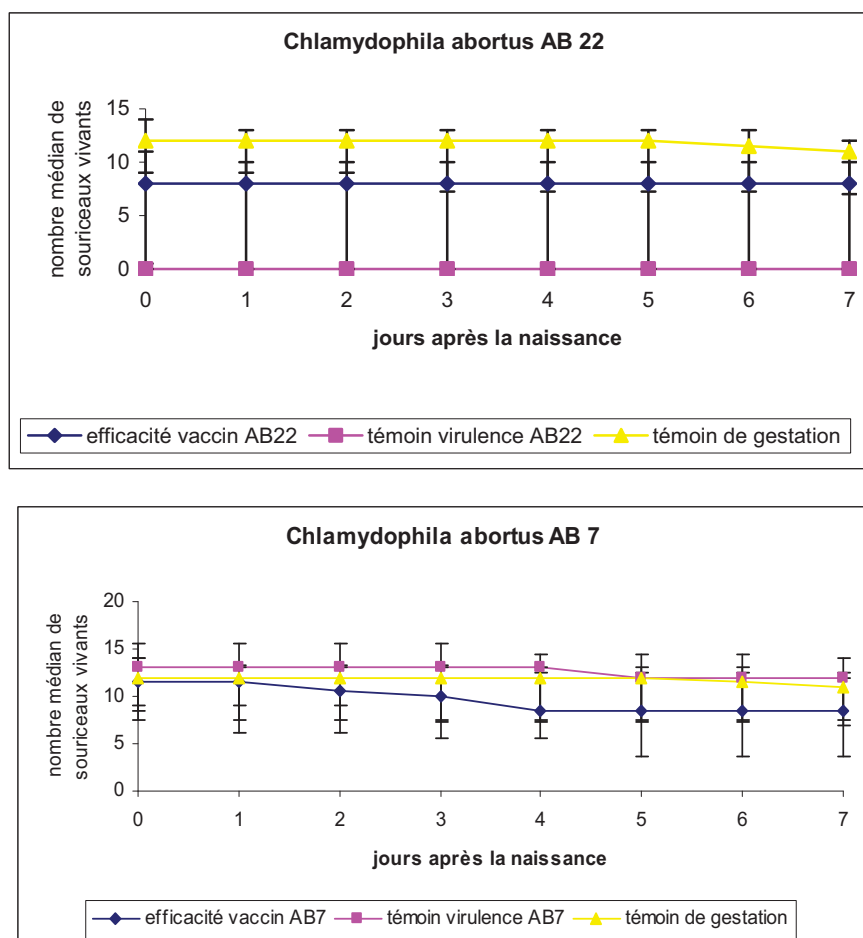


Figure 8: Nombre médian de souriceaux vivants par portée dans des lots de souris vaccinées et non vaccinées, après une inoculation intrapéritonéale à 10 ± 1 jours de gestation par les souches AB 22 et AB 7.

Le nombre médian de souriceaux vivants pendant une semaine dans le lot des souris témoins de l'efficacité du vaccin vis-à-vis de la souche AB 22 est stable et proche de celui du lot témoin de gestation (Fig. 8). D'après le test de Student, la probabilité que les moyennes de souriceaux vivants à sept jours *post partum* de ces deux lots soient égales s'élève à 0,136. Le nombre moyen de souriceaux vivants sept jours après la mise bas des souris vaccinées est très significativement différent de celui du lot témoin de la virulence de cette souche ($p = 0,0004$).

Il n'y a pas de différence significative entre le nombre médian de souriceaux vivants dans la semaine suivant le part des souris témoins de la virulence de la souche AB 7 et celui des souris témoins de gestation (Fig. 8). D'après le test de Student, la probabilité que les moyennes de souriceaux vivants à sept jours *post partum* de ces deux lots soient égales s'élève à 0,261. Les résultats obtenus dans les lots de souris inoculées par la souche AB 7 ne sont pas interprétables.

Les résultats de cette expérience nous permettent donc de conclure que le vaccin Cevac ChlamydiaND protège réellement les souris contre une infection par *C. abortus* AB 22.

Discussion

Une des premières difficultés que nous avons rencontrée est liée au fait que la première partie de cette étude a été effectuée « sur le terrain » et non pas dans des « conditions expérimentales ». Il est illusoire de vouloir établir et respecter un protocole expérimental trop strict en collaborant individuellement avec un nombre élevé de protagonistes, *a fortiori* avec des éleveurs qui sont déjà débordés par leur travail en période d'agnelage. Cependant, les éleveurs avec qui j'ai eu l'honneur de travailler ont montré beaucoup de bonne volonté et un vif intérêt pour cette étude. Ainsi, si le nombre d'échantillons de mucus vaginaux obtenus et utilisables pour l'isolement de bactéries est inférieur à nos espérances, les éleveurs m'ont par la suite accordé tout le temps et m'ont fourni toutes les informations nécessaires à l'établissement de mon enquête.

C. abortus n'a pu être multipliée qu'à partir des écouvillons vaginaux effectués sur quatre brebis de trois des neufs élevages enquêtés (souches AB 21, ab 22 et ab 23). Ces brebis présentaient des signes cliniques compatibles avec une infection par *C. abortus* et trois d'entre elles avaient fait l'objet d'une analyse PCR confirmant ce diagnostic.

La fragilité des corps élémentaires, forme infectieuse extracellulaire de *C. abortus*, explique la difficulté d'isoler des souches à partir de prélèvements effectués sur le terrain. Le transport et la conservation des *Chlamydiales* sont les facteurs limitants de leur isolement (Rekiki et al., 2002). Les échantillons doivent donc être prélevés et congelés le plus rapidement possible (Spencer et Johnson, 1983, Tjiam et al., 1984, Mahony et Chernesky, 1985, Rekiki, 2004, OIE, 2005a). Une congélation des échantillons à -75°C est nécessaire si on veut les conserver plus de 48 heures, la perte du pouvoir infectieux des *Chlamydiales* étant alors limitée à entre 11 et 20% (Storz, 1971, Reeve et al., 1975, Tjiam et al., 1984, Mahony et Chernesky, 1985, Maass et Dalhoff, 1995, Corsaro et Greub, 2006). La viabilité des *Chlamydiales* est encore moins altérée à -196°C et elles peuvent être conservées des mois durant dans l'azote liquide (Prentice et Farrant, 1977, Ngeow et al., 1981, Sherman et Jordan, 1985). La méthode de conservation des écouvillons vaginaux de notre protocole peut être améliorée pour optimiser les chances d'isoler *C. abortus*. Le respect de la chaîne du froid est essentiel et les prélèvements doivent être conditionnés dans des cryotubes spécialement conçus pour la conservation d'échantillons à très basse température (Prentice et Farrant,

1977). Les tubes en plastique sont plus résistants à l'azote liquide que les tubes en verre. Les tubes doivent être enveloppés dans une gaine spécifique avant d'être placés dans l'azote liquide pour éviter leur éclatement.

Le conditionnement des écouvillons dans un milieu de transport permettant la survie des *C. abortus* sur le long terme et ne présentant pas de cytotoxicité aurait pu accroître les chances d'isoler des bactéries (Spencer et Johnson, 1983). Le tampon SPG (Sucrose Phosphate Glutamine) supplémenté de 10% de sérum foetal bovin, de gentamycine et de fongicide semble être le plus approprié (Reeve et al., 1975, Prentice et Farrant, 1977, Mardh et Zeeberg, 1981, Johnson et al., 1983, Tjiam et al., 1984, Maass et Dalhoff, 1995, Andersen, 2004, OIE, 2005a, Corsaro et Greub, 2006). La présence d'agents cryoprotecteurs, saccharose et albumine sérique, est essentielle pour obtenir un taux de survie à la congélation significatif (Prentice et Farrant, 1977, Maass et Dalhoff, 1995). Certains auteurs déclarent même que le taux d'isolement sur culture cellulaire de *Chlamydiales* à partir d'échantillons congelés dans de l'azote liquide sous ces conditions est égal à celui obtenu à partir d'une mise en culture directe (Prentice et Farrant, 1977, Ngeow, 1981).

L'isolement et la multiplication de la souche AB 22 par mise en culture sur des cellules Mc Coy et sur des œufs embryonnés ont été couronnés de succès. Cette souche a été identifiée par PCR-RFLP.

La souris est un modèle expérimental de choix pour l'étude de la chlamydophilose abortive ovine de par sa facilité d'élevage, sa courte durée de gestation, sa fertilité et sa prolificité élevée, et bien sur son coût à l'achat et à l'entretien moindres comparé à la brebis (Rekiki et al., 2003). Suite à l'inoculation des souris avec différentes dilutions des souches AB 22 et AB 7, nous avons observé des avortements, de la mortinatalité dans les 48h suivant la mise bas et une diminution du taux de survie des souriceaux dans la semaine *post partum*. Ce dernier point pourrait être expliqué par la naissance de souriceaux infectés *in utero* ou par leur contamination *post partum* au contact de leurs mères (Buzoni-Gatel et Rodolakis, 1983). D'autre part, plusieurs portées étaient à la fois constituées de souriceaux viables et de souriceaux morts nés. Le modèle murin peut donc être transposé au modèle ovin pour l'étude des effets de la virulence d'une souche *C. abortus* et la détermination de l'efficacité d'un vaccin contre cette souche (Rodolakis, 1976a, 1976b, 1983, Buzoni-gatel et Rodolakis, 1983, Caro et al., 2008).

Nos expériences ont permis de montrer que la vaccination de souris deux mois avant une forte épreuve virulente à mi-gestation permet l'établissement d'une immunité protectrice. Non seulement les souris vaccinées et inoculées par voie intrapéritonéale avec une dose infectante élevée de *C. abortus* AB 22 survivent à cette épreuve mais elles obtiennent des résultats de reproduction significativement différents de ceux des souris non vaccinées. Les données bibliographiques stipulent qu'un vaccin est efficace contre une souche *C. abortus* donnée si pour des lots de douze souris infectées par voie intrapéritonéale à mi-gestation, la taille des portées des souris vaccinées atteint quatre souriceaux viables à une semaine de vie et si aucun souriceau ne survit dans le lot non vacciné (Rodolakis et al., 1981). D'autre part, il ne doit pas exister de différence significative en termes de nombre médian de souriceaux par portée entre le lot des souris vaccinées et le lot témoin de gestation (Rekiki et al., 2003). Dans notre expérience, l'inoculation de seize souris OF1 SPF non vaccinées par une dose de *C. abortus* AB 22 à la dose 10^6 bactéries/souris a causé la mort de quatre d'entre elles et aucun souriceau viable n'est né. L'infection de seize autres souris préalablement vaccinées à partir du même inoculum a permis d'obtenir un nombre médian de huit souriceaux vivants sur une semaine. Le nombre médian de souriceaux vivants à sept jours *post partum* dans le lot des souris témoins de gestation s'élève à onze souriceaux par portée. Le vaccin vivant thermosensible 1B Cevac ChlamydiaND est donc efficace contre la souche AB 22.

Contrairement aux observations effectuées lors du dénombrement des souriceaux vivants une semaine après les mises bas des souris inoculées avec les souches AB 22 et AB 7 pour déterminer la dose abortive de *C. abortus*, le nombre de souriceaux vivants dans le lot des souris vaccinées et inoculées par la souche AB 22 n'a pas diminué au cours de la semaine *post partum*. Ceci peut être expliqué par le fait que les souris immunisées par la vaccination et infectées n'excrètent pas de bactéries autour de la mise bas et qu'elles ne contaminent donc pas leurs souriceaux. Cette hypothèse est conforme avec les données bibliographiques concernant l'absence d'excrétion de *C. abortus* chez les brebis vaccinées (Rodolakis et Souriau, 1983, Rodolakis et al., 1998, Andersen, 2004).

Le vaccin vivant thermosensible 1B protège donc les souris, et par analogie les brebis, d'une infection par la souche *C. abortus* AB 22 isolée à partir du mucus vaginal d'une brebis naturellement infectée par cette souche.

Conclusion de la thèse

La vaccination des brebis avec le vaccin Cevac ChlamydiaND est une mesure efficace de prévention de l'infection, de limitation de l'expression clinique de la maladie et de l'excrétion de bactéries par les animaux infectés. Tous les animaux doivent être vaccinés, y compris les béliers et les animaux originaires d'un autre cheptel, au moins une fois dans leur vie. L'observance du protocole de vaccination est impérative pour optimiser les effets de la vaccination d'un cheptel. La vaccination des animaux à un jeune âge, à partir de trois mois, pourrait limiter le risque d'infection au contact d'animaux excréteurs. Il serait intéressant d'évaluer l'impact de la précocité de la vaccination et le niveau d'infection réel des agnelles en *peri partum* pour éventuellement modifier le protocole de vaccination. Une étude comparative de la réponse immunitaire induite par la vaccination des agnelles à trois mois à celle de brebis adultes permettrait de déterminer si leur degré de protection est équivalent. Dans le cas contraire, l'efficacité d'un rappel sur les agnelles avant la lutte serait à étudier.

La vaccination du troupeau ne permet pas à elle seule d'enrayer l'expansion de la maladie. Des mesures prophylactiques doivent obligatoirement y être associées, notamment en matière de gestion des lots d'animaux sur l'année, de conduite d'élevage autour du part et d'hygiène des lieux de mise bas. Ces mesures sont d'autant plus importantes dans les systèmes d'élevage intensifs où la concentration des animaux favorise la diffusion de *C. abortus*.

A l'aide d'un modèle expérimental murin, nous avons démontré l'efficacité du vaccin Cevac ChlamydiaND vis-à-vis de la souche *C. abortus* AB 22 isolée sur une brebis ayant mis bas un agneau mort né et un agneau apparemment sain dans un élevage de l'Aveyron (12, France). Nous n'avons pas pu isoler d'autres souches *C. abortus* pour tester l'efficacité du vaccin sur d'autres souches locales mais, à notre connaissance, aucun cas de résistance ou d'échappement à la réponse immunitaire induite par ce vaccin vivant n'a été reporté à ce jour.

Si l'efficacité de la vaccination avec un vaccin vivant ne fait aucun doute sur le plan théorique, des échecs sont tout de même observés sur le terrain puisque des avortements ont été imputés à *C. abortus* dans des élevages qui vaccinaient depuis des années. Un faible niveau d'infection persiste dans ces élevages, même chez les éleveurs à très haut niveau technique. Les connaissances actuelles en matière d'épidémiologie de la chlamyphilose ne permettent pas de répondre à toutes les questions des éleveurs. Il me semble tout de même que la présence ou l'introduction d'animaux infectés latents dans un troupeau joue un rôle

essentiel dans notre problématique. Des investigations supplémentaires sur la prévalence des infections latentes sur le terrain et sur l'origine et le mécanisme de telles infections nous permettraient de mieux comprendre la pathogénie de la chlamydophilose pour pouvoir mieux répondre aux attentes des éleveurs.

La vaccination des agnelles doit être poursuivie tant qu'il reste des animaux infectés latents et que des animaux au statut inconnu sont introduits pour le renouvellement. Une question reste alors en suspens : quand pourra-t-on arrêter de vacciner les agnelles d'un troupeau ?

Références bibliographiques

- AITKEN, I. D., Chlamydial abortion. In: MARTIN, W. B., AITKEN, I. D., Diseases of sheep, third edition. Oxford: Blackwell science, 2000, 81-86.
- APPELYARD, W. T., AITKEN, I. D., ANDERSON, I. E., Attempted venereal transmission of *Chlamydia psittaci* in sheep, *Vet. Rec.*, **116**, 535-538.
- ANDERSEN, A. A., Chlamydiosis. In: Infectious diseases of Livestock, Volume one, 2nd edition. Oxford: Oxford university press, 2004, 550-564.
- BANKS, J., EDDIE, B., SCHACHTER, J., MEYER, K. F., Plaque Formation by *Chlamydia* in L Cells, *Inf. and Immunity*, 1970, **1**, 259-262.
- BECERRA; V. M., ATA, F. A., STORZ, J., Studies on the Response of Ewes to Live Chlamydiae Adapted to Chicken Embryos or Tissue Culture, *Can. J. comp. Med.*, 1976, **40**, 46-52.
- BERRI, M., SOURIAU, A., CROSBY, M., CROCHET, D., LECHOPIER, P., RODOLAKIS, A., Relationship between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 ewes, *Vet. Rec.*, 2001, **148**, 502-505.
- BERRI, M., BERNARD, F., LECU, A., OLLIVET-COURTOIS, F., RODOLAKIS, A., Molecular characterisation and ovine live vaccine 1B evaluation toward a *Chlamydomphila abortus* strain isolated from springbok antelope abortion, *Vet. Microbiol.*, 2004, **103**, 231-240.
- BOREL, N., SACHSE, K., RASSBACH, A., BRUCKNER, L., VRTETOU, E., PSARROU, E., POSPISCHIL, A., Ovine Enzootic Abortion (OEA): Antibody Response in Vaccinated Sheep Compared to Naturally Infected Sheep, *Vet. Res. Communications*, 2005, **29**, 151-156.
- BOUAKANE, A., REKIKI, A., RODOLAKIS, A., Protection of pregnant mice against placental and splenic infection by tree strains of *Chlamydomphila abortus* with a live 1B vaccine, *Vet. Rec.*, 2005, **157**, 771-774.
- BUXTON, D., BARLOW, R. M., FINLAYSON, J., ANDERSON, I. E., MACKELLAR, A., Observations on the Pathogenesis of *Chlamydia psittaci* Infection of Pregnant Sheep, *J. Comp. Path.*, 1990, **102**, 221-236.
- BUZONI-GATEL, D. and RODOLAKIS, A., A mouse model to compare virulence of abortive and intestinal ovine strains of *Chlamydia psittaci*: influence of the route of inoculation, *Ann. Microbiol.*, 1983, **134 A**, 91-99.
- CARO, M. R., ORTEGA, N., BUENDIA, A. J., GALLEGRO, M. C., DEL RIO, L., CUELLO, F., SALINAS, J., Protection conferred by commercially available vaccines against *Chlamydomphila abortus* in a mouse model, *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 492-493.
- CARO, M. R., BUENDIA, A. J., DEL RIO, L., ORTEGA, N., GALLEGRO, M. C., CUELLO, F., NAVARRO, J. A., SANCHEZ, J., SALINAS, J., *Chlamydomphila abortus* infection in the

- CHALMERS, G. A., KLAVANO, G. G., NAGGE, W. T., CHRISTIAN, R. G., Ovine Chlamydial abortion in Alberta, *Can. Vet. Jour.*, 1976, **17**, 76-81.
- CHALMERS, W. S. K., SIMPSON, J., LEE, S. J., BAXENDALE, W., Use of a live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion, *Vet. Rec.*, 1997, **141**, 63-67.
- CORSARO, D. and GREUB, G., Pathogenic Potential of Novel Chlamydiae and Diagnostic Approaches to Infections Due to These Obligate Intracellular Bacteria, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006, **19**, 283-297.
- DENAMUR, E., SAYADA, C., SOURIAU, A., ORFILA, J., RODOLAKIS, A., ELION, J., Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*, *J. Gen. Microbiol.*, 1991, **137**, 2525-2530.
- ENTRICAN, G., BUXTON, D., LONGBOTTOM, D., Chlamydial infection in sheep: immune control versus foetal pathology, *J. R. Soc. Med.*, 2001, **94**, 273-277.
- EVERETT, K. D. E. and ANDERSEN, A. A., Identification of nine species of the *Chlamydiaceae* using PCR-RFLP, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, **49**, 803-813.
- EVERETT, K. D. E., *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye, *Vet. Microbiol.*, 2000, **75**, 109-126.
- FAYE, P., CHARTON, A., MAGE, C., BERNARD, C. et LE LAYEC, C., Propriétés hémagglutinantes du « virus » de l'avortement enzootique des petits ruminants (souches de Rakeia d'origine ovine et caprine), *Bull. Acad. Vét. Fr.*, 1972, **45**, 169-173.
- GARCIA DE LA FUENTE, J. N., GUTIERREZ-MARTIN, C. B., ORTEGA, N., RODRIGUEZ-FERRI, E. F., DEL RIO, M. L., GONZALES, O. R., SALINAS, J., Efficacy of different commercial and new inactivated vaccines against ovine enzootic abortion, *Vet. Microbiol.*, 2004, **100**, 65-76.
- GERBER, A., THOMA, R., VRETOU, E., PSARROU, E., KAISER, C., DOHERR, MG., ZIMMERMANN, D. R., POLKINGHORNE, A., POSPISCHIL, A., BOREL, N., Ovine Enzootic Abortion (OEA): a comparison of antibody responses in vaccinated and naturally-infected swiss sheep over a two year period. *BMC Veterinary Research* [en ligne]. **3**: 24. 28-09-2007 [cite le 21-04-2008]. 10.1186/1746-6148-3-24. Disponibilité et accès: <<http://www.biomedcentral.com/>>
- GREIG, A., LINKLATER, K. A., DYSON, D. A., Long-acting oxytetracycline in the treatment of enzootic abortion of ewes, *Vet. Rec.*, 1982, **111**, 445-446.
- JOHNSON, F. W. A., CLARKSON, M. J., SPENCER, W. N., Direct isolation of the agent of enzootic abortion of ewes (*Chlamydia psittaci*) in cell cultures, *Vet. Rec.*, 1983, **113**, 413-414.

- JOHNSON, F. W. A., MATHESON, B. A., WILLIAMS, H., LAING, A. G., JANDIAL, V., DAVIDSON-LAMB, R., HALLIDAY, G. J., HOBSON, D., WONG, S. Y., HALEY, K. M., MOFFAT, M. A. J., POSTLETHWAITE, R., Abortion due to infection with *Chlamydia psittaci* in a sheep farmer's wife, *Brit. Med. J.*, 1985, **290**, 592-594.
- LHERM, C., Classement des agents biologiques. In : INRS, Documents pour le médecin du travail, 1999, **79**, 289-295.
- LIVINGSTONE, M., WHEELHOUSE, N., MALEY, S. W., LONGBOTTOM, D., Molecular detection of *Chlamydophila abortus* in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing, *Vet. Microbiol.*, 2008, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.033.
- LONGBOTTOM, D. and LIVINGSTONE, M., Vaccination against chlamydial infections of man and animals, *Vet. J.*, 2006, **17**, 263-275.
- MAASS, M. and DALHOFF, K., Transport and Storage Conditions for Cultural Recovery of *Chlamydia pneumoniae*, *J.Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 1793-1796.
- MAHONY, J. B. and CHERNESKY, M. A., Effect of Swab Type and Storage Temperature on the Isolation of *Chlamydia trachomatis* from Clinical Specimens, *J.Clin. Microbiol.*, 1985, **22**, 865-867.
- MALEY, S. W., LIVINGSTONE, M., RODGER, S. M., LONGBOTTOM, D., BUXTON, D., Identification of *Chlamydophila abortus* and the development of lesions in placental tissues of experimentally infected sheep, *Vet. Microbiol.*, 2008, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.031.
- MEIJER, A., KWAKKEL, G. J., DE VIRIES, A., SCHOULS, L. M., OSSEWAARDE, J. M., Species identification of *Chlamydia* Isolates by Analyzing Restriction Fragment Length Polymorphism of the 16S-23S rRNA Spacer Region, *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**, 1179-1183.
- MICHALOPOLOU, E., LEIGH, A. J., CORDOBA, L. G., Detection of the genome of *Chlamydophila abortus* in samples taken from the uteri of 304 sheep at an abattoir, *Vet. Rec.*, 2007, **161**, 153-155.
- MILLER, M. A., TURK, J. R., NELSON, S. L., VAN DER LEK, A. P., SOLORZANO, R., FALES, W. H., MOREHOUSE, L. G., GOSSER, H. S., Chlamydial infection in aborted and stillborn lambs, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1990, **2**, 55-58.
- MILNE, C. E., GUNN, G. J., ENTRICAN, G., LONGBOTTOM, D., Epidemiological modelling of chlamydial abortion in sheep flocks, *Vet. Microbiol.*, 2008, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.032.
- NGEOW, Y., F., MUNDAY, P. E., EVANS, R. T., TAYLOR-ROBINSON, D., Taking cell cultures to the patient in an attempt to improve chlamydial isolation, *Br. J. Vener. Dis.*, 1981, **57**, 44-46.
- NIETFELD, J. C., Chlamydial infection in small ruminants, *Vet. Clin. N. Am.: food animal practice*, 2001, **17**, 301-314.

- OIE. Avortement enzootique des brebis (Chlamydiose ovine) [en ligne]. 03-09-2007 [cité le 15-10-2008]. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE-2005 ([Manuel terrestre de l'OIE - 2005](#)), partie 2., section 2.4., chapitre 2.4.7. Disponibilité et accès: « http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/pdf_fr/chapitre%20final05%202.4.7_avortementenzoo.pdf »
- OIE. La biosécurité au laboratoire de microbiologie vétérinaire [en ligne]. 03-09-2007 [cité le 15-10-2008]. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE-2005 ([Manuel terrestre de l'OIE - 2005](#)), partie 1., section 1.1., chapitre 1.1.6. Disponibilité et accès: « http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/pdf_fr/Chapitre%20final05%201.1.6_Bios%20E9curit%20E9.pdf »
- ONGOR, H., CETINKAYA, B., ACIK, M. N., KARAHAN, M., BULUT, H., Detection of *Chlamydomphila abortus* in Ovine Milk by Immunomagnetic Separation-Polymerase Chain Reaction, *J. Vet. Med.*, 2004, **B 50**, 43-45.
- PAPP, J. R., SHEWEN, P. A., GARTLEY, C. J., Abortion and Subsequent Excretion of *Chlamydomphila* from the Reproductive Tract of Sheep during Estrus, , 1994, **62**, 3786-3792.
- PAPP, J. R., SHEWEN, P. E., Pregnancy Failure following Vaginal Infection of Sheep with *Chlamydia psittaci* prior to Breeding, *Inf. and Immunity*, 1996, 1116-1125.
- PAPP, J. R., SHEWEN, P. E., THORN, C. E., ANDERSEN, A. A., Immunocytologic Detection of *Chlamydia psittaci* from Cervical and Vaginal Samples of Chronically Infected Ewes, *Can. J. Vet. Res.*, 1998, **62**: 72-74.
- PHILIPS, H. L., and CLARKSON, M. J., Investigation of Pre-natal *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci*) Exposure of Female Lambs and the Outcome of their First Pregnancy, *The Vet. J.*, 2002, **163**, 329-330.
- PLOMMET, M., Le vaccin *Chlamydia* ovin: péripéties d'une recherche, *Bull. Soc. Vét. Prat. de France*, 1997, **81**, 171-178.
- PRENTICE, M. J. and FARRANT, J., Survival of Chlamydiae After Cooling to -196°C, *J. Clin. Microbiol.*, 1977, **6**, 4-9.
- REEVE, P., OWEN, J., ORIEL, J. D., Laboratory procedures for the isolation of *Chlamydia trachomatis* from the human genital tract, *J. Clin. Path.*, 1975, **28**, 910-914.
- REKIKI, A., SIDI-BOUMEDINE, K., SOURIAU, A., JEMLI, J., HAMMAMI, S., RODOLAKIS, A., Isolation and characterisation of local strains of *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) from Tunisia, *Vet. Res.*, 2002, **33**, 215-222.
- REKIKI, A., BOUAKANE, A., BERARD, F., HAMMAMI, S., RODOLAKIS, A., Effectiveness of vaccine strain 1B against Tunisian field strains of *Chlamydomphila abortus* using mouse model, *Revue Méd. Vét.*, 2003, **154**, 7, 463-468.

- REKIKI, A., Chlamydie abortive en Tunisie : Tests de Diagnostic, caractérisation moléculaire, phylogénétique de souches de *Chlamydomphila* et Etude de la protection du vaccin vivant 1B, Th. : Sciences de la Vie et de la Santé : Tours, U. F. R. : 2004. 233.
- REKIKI, A., BOUAKANE, A., HAMMAMI, S., EL IDRISSE, A. H., BERNARD, F., RODOLAKIS, A., Efficacy of live *Chlamydomphila abortus* vaccine 1B in protecting mice placentas and fetuses against strains of *Chlamydomphila pecorum* isolated from cases of abortion, *Vet. Microbiol.*, 2004, **99**, 295-299.
- ROCCHI, M. S., WATTEGEDERA, S., MERIDIANI, I., ENTRICAN, G., Protective adaptive immunity to *Chlamydomphila abortus* infection and control of ovine enzootic abortion (OEA), *Vet. Microbiol.*, 2008, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.030.
- RODOLAKIS, A., Infection abortive de la souris inoculée par voie intrapéritonéale avec *Chlamydia ovis*, *Ann. Rech. Vétér.*, 1976, **7**, 195-205.
- RODOLAKIS, A., La souris gestante, modèle de la chlamydie abortive de la brebis, *Bull. Acad. Vét. De France*, 1976, **49**, 101-106.
- RODOLAKIS, A., BERNARD, K., Isolement de *Chlamydomphila* des organes génitaux de béliers atteints d'épididymite, *Bull. Acad. Vét. De France*, 1977, **50**, 65-70.
- RODOLAKIS, A. et CHANCERELLE, L., Dénombrement direct à l'isolement de *Chlamydia psittaci* au moyen de la technique des plages de lyse, *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1977, **128 B**, 81-85.
- RODOLAKIS, A. and SOURIAU, A., Clinical Evaluation of Commercial Vaccine against *Chlamydomphila* Abortion of Ewes, *Ann. Rech. Vét.*, 1979, **10**, 41-48.
- RODOLAKIS, A. and SOURIAU, A., Clinical evaluation of immunity following experimental or natural infection of ewes with *Chlamydia psittaci* (var. *ovis*), *Ann. Rech. Vet.*, 1980, **11**, 215-223.
- RODOLAKIS, A., SOURIAU, A., RAYNAUD, J.-P., BRUNAULT, G., Efficacy of a Long-acting Oxytetracycline against *Chlamydomphila* Ovine Abortion, *Ann. Rech. Vét.*, 1980, **11**, 437-444.
- RODOLAKIS, A., GESTIN, L., BERTIN, A., Méthode de contrôle des vaccins contre la Chlamydie abortive ovine utilisant la souris gestante, *Ann. Rech. Vét.*, 1981, **12**, 371-377.
- RODOLAKIS, A., In Vitro and In Vivo Properties of Chemically Induced Temperature-Sensitive Mutants of *Chlamydia psittaci* var. *ovis*: Screening in a Murine Model, *Inf. and Immunity*, 1983, 525-530.
- RODOLAKIS, A. and SOURIAU, A., Response of Ewes to Temperature-sensitive Mutants of *Chlamydia psittaci* (var *ovis*) obtained by NTG Mutagenesis, *Ann. Rech. Vét.*, 1983, **14**, 155-161.
- RODOLAKIS, A. and BERNARD, F., Vaccination with temperature-sensitive mutant of *Chlamydia psittaci* against enzootic abortion of ewes, *Vet. Rec.*, 1984, **114**, 193-194.

- RODOLAKIS, A., BERNARD, F. and LANTIER, F., Mouse models for evaluation of virulence of *Chlamydia psittaci* isolated from ruminants, *Res. in Vet. Sc.*, 1989, **46**, 34-39.
- RODOLAKIS, A. and SOURIAU, A., Restriction endonuclease analysis of DNA from ruminant *Chlamydia psittaci* and its relation to mouse virulence, *Vet. Microbiol.*, 1992, **31**, 263-271.
- RODOLAKIS, A. et SOURIAU, A., Chlamydirose. In : RODOLAKIS, A. et NETTLETON, P., Manuel pratique de diagnostic de laboratoire des avortements infectieux des petits ruminants, 1^o édition. Rome : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, 1997, 69.
- RODOLAKIS, A., SALINAS, J., PAPP, J., Recent advances on ovine *Chlamydia abortus*, *Vet. Res.*, 1998, **29**, 275-288.
- SAMMIN, D. J., MARKEY, B. K., BASSETT, H. F., MC ELROY, M. C., Rechallenge of Previously-infected Pregnant Ewes with *Chlamydia abortus*, *Vet. Res. Com.*, 2005, **29**, 81-98.
- SAYADA, C., ANDERSEN, A., RODRIGUEZ, P., EB, F., MILON, A., ELION, J., DENAMUR, E., Homogeneity of the major outer membrane protein gene of feline *Chlamydia psittaci*, *Res. in Vet. Sc.*, 1994, **56**, 116-118.
- SAYADA, C., ANDERSEN, A., STOREY, C., MILON, A., EB, F., HASHIMOTO, N., HIRAI, K., ELION, J. and DENAMUR, E., Usefulness of *omp1* restriction mapping for avian *Chlamydia psittaci* isolate differentiation, *Res. Microbiol.*, 1995, **146**, 155-165.
- SHERMAN, J. K. and JORDAN, G. W., Cryosurvival of *Chlamydia trachomatis* during cryopreservation of human spermatozoa, *Fert. and Ster.*, 1985, **43**, 664-666.
- SPENCER, W., N. and JOHNSON, F. W. A., Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical materials, *Vet. Rec.*, 1983, **113**, 535-536.
- STORZ, J., *Chlamydia* and *Chlamydia*-Induced Diseases. 1^o edition. Springfield: Charles C Thomas·Publisher, 1971. 358p.
- STORZ, J., CARROLL, E. J., STEPHENSON, E. H., BALL, L., EUGSTER, A. K., Urogenital Infection and Seminal Excretion After Inoculation of Bulls and Rams with *Chlamydiae*, *Am. J. Vet. Res.*, 1976, **37**, 517-520.
- THOMSON, N. R., YEAST, C., BELL, K., HOLDEN, M. T. G., BENTLEY, S. D., LIVINGSTONE, M., CERDENO-TARRAGA, A. M., HARRIS, B., DOGGETT, J., ORMOND, D., MUNGALL, K., CLARKE, K., FELTWELL, T., HANCE, Z., SANDERS, M., QUAIL, M. A., PRICE, C., BAREEL, B. G., PARKHILL, J., LONGBOTTOM, D., The *Chlamydia abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation, *Genome Res.*, 2005, **15**, 629-640.
- TJIAM, K. H., VAN HEIJST, B. Y. M., DE ROO, J. C., DE BEER, A., VAN JOOST, T. H., MICHEL, M. F., STOLZ, E., Survival of *Chlamydia trachomatis* in different transport media and at different temperatures: Diagnostic implications, *Br. J. Vener. Dis.*, 1984, **60**, 92-94.

- VRETOU, E., RADOUANI, F., PSARROU, E., KRITIKOS, I., XYLOURI, E., MANGANA, O., Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydophila abortus* antibodies, *Vet. Microbiol.*, 2007, **123**, 153-161.
- WILSON, K., LIVINGSTONE, M., LONGBOTTOM, D., Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydophila abortus* infection in sheep, *Vet. Microbiol.*, 2008, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.043.
- WILSMORE, A. J., PARSONS, V., DAWSON, M., Experiments to demonstrate routes of transmission of ovine enzootic abortion, *Br. Vet. J.*, 1984, **140**, 380-391.
- WILSMORE, A. J., IZZARD, K. A., WILSMORE, B. C., DAGNALL, G. J. R., Breeding performance of sheep infected with *Chlamydia psittaci* (*ovis*) during their preceding pregnancy, *Vet. Rec.*, 1990, **126**, 40.
- WONG, S. Y., GRAY, E. S., BUXTON, D., FINLAYSON, J., JOHNSON, F. W. A., Acute placentitis and spontaneous abortion caused by *Chlamydia psittaci* of sheep origin: a histological and ultrastructural study, *J. Clin. Pathol.*, 1985, **38**, 707-711

Annexe 1 : Compléments d'informations sur la Chlamyphilose Abortive Ovine.

I. Pathologies de la reproduction

a) Epidémiologie et clinique

Le principal signe clinique observé lors d'infection par la chlamyphilose est l'avortement en fin de gestation, sans altération de l'état général de la brebis (Storz, 1971, Rodolakis et Souriau, 1980, Miller et al., 1990, Rodolakis et al., 1998, Aitken, 2000, Nietfeld, 2001, Rekiki, 2003 et 2004, Andersen, 2004, Livingstone et al., 2008). Il n'y a généralement aucun signe précurseur à l'avortement et les brebis se remettent bien ensuite (Aitken, 2000). Les rétentions placentaires suivies de métrites sont rares chez les ovins (Aitken, 2000, Nietfeld, 2001). De l'hypogalactie peut être constatée si l'avortement intervient suffisamment tôt.

Une infection en début de gestation peut être cause de mortalité embryonnaire qui passe inaperçue, la brebis revenant en chaleur tardivement (Aitken, 2000). Si les brebis sont infectées à mi-gestation le risque d'avortement s'élève à 80%. Si l'infection a lieu après 110 jours de gestation la brebis mettra bas à des agneaux chétifs et porteurs ou mettra bas normalement l'année de l'infection et avortera dans les années qui suivent (Chalmers et al, 1976, Rodolakis et Souriau, 1980, Chalmers et al., 1997, Rodolakis et al., 1998, Nietfeld, 2001, Rekiki et al., 2003, Milne et al., 2008).

Les épisodes abortifs causés par la chlamyphilose dans les troupeaux de petits ruminants se traduisent par l'expulsion d'avortons dans le dernier tiers de gestation ou la mise bas à terme d'agneaux morts nés ou chétifs et difficiles à élever, mourant souvent dans les premières 48h. Certaines portées sont composées à la fois d'agneaux chétifs et en bon état général. (Storz, 1971, Rodolakis et Souriau, 1980, Miller et al., 1990, Wilsmore et al., 1990, Papp et Shewen, 1996, Chalmers et al., 1997, Rodolakis et al., 1998, Aitken, 2000, Entrican et al., 2001, Nietfeld, 2001, Rekiki et al., 2003, Rekiki, 2004, Andersen, 2004)

Il est rare qu'une brebis avorte deux fois de chlamyphilose car l'immunité à médiation cellulaire acquise lors d'une primo-infection la protégerait d'une nouvelle phase de chlamydémie et colonisation du trophoblaste (Becerra et al., 1976, Chalmers et al, 1976,

Rodolakis et Souriau, 1980, Wilsmore et al., 1984, Miller et al., Wilsmore et al., 1990, Papp et Shewen, 1996, Rodolakis et al., 1998, Aitken, 2000, Rekiki et al., 2003, Bouakane, 2005, Sammin et al., 2005, Livingstone et al., 2008, Milne et al., 2008, Rocchi et al., 2008). Par contre, une exposition successive de brebis naïves à un environnement contaminé n'induit pas chez elles d'immunité suffisamment forte et durable pour empêcher l'expression clinique de la maladie et l'excrétion de *Chlamydophila* lors de leurs gestations suivantes (Rodolakis et Souriau, 1980).

En cas de primo-infection d'un troupeau, près d'un tiers des brebis gravides peuvent avorter la première année où la maladie se manifeste. Dans le cas général, on observe des taux très élevés d'avortements pendant deux ans puis ces derniers semblent se stabiliser autour de 10 % jusqu'au jour où l'on observe une nouvelle flambée d'avortements chez les primipares. (Storz, 1971, Rodolakis et al., 1998, Aitken, 2000, Nietfeld, 2001, Rekiki et al., 2003, Milne et al., 2008)

b) Pathogénie

La contamination des brebis saines se fait par voie oro-pharyngée, par ingestion de placentas contaminés, d'aliments et d'eaux souillés ou par contact étroit avec une brebis avortée ou les produits de son part (Chalmers et al., 1976, Wilsmore et al., 1984, Rodolakis et al., 1998, Aitken, 2000, Rekiki et al., 2003, Andersen, 2004). *C. abortus* se retrouve au niveau des macrophages et des cellules épithéliales des tonsilles palatines et gagne la circulation sanguine et lymphatique, puis les organes somatiques avant une nouvelle phase de chlamydémie. L'infection du placenta d'une brebis gravide débute au niveau du hile d'un certain nombre de placentomes et fait suite à une phase de chlamydémie. L'invasion du stroma caronculaire par les villosités choriales dès 60 jours de gestation entraîne la formation d'hématomes qui constituent le point de départ de la colonisation du placenta par *C. abortus*. (Storz, 1971, Buxton et al., 1990, Aitken, 2000, Entrican et al., 2001, Maley et al., 2008, Rocchi et al., 2008)

L'infection du placenta par *C. abortus* débute à partir de 85-90 jours de gestation et les lésions inflammatoires sont maximales à 120 jours de gestation. Ces lésions sont caractérisées par de la nécrose, la destruction des cellules épithélio-choriales fœtales lors de la multiplication des *Chlamydophila*, des vascularites et thromboses des vaisseaux sanguins fœtaux au niveau du hile des placentomes induites par des cytokines et l'infiltration du

placenta fœtal par des cellules mononuclées et des neutrophiles. L'inflammation causée par l'invasion du placenta par *C. abortus* entraîne une diminution des échanges maternels-fœtaux et donc des retards de croissance du fœtus voir la mort de ce dernier. L'infection du fœtus via les vaisseaux sanguins allanto-choriaux permet la colonisation de ses organes internes par *C. abortus*. On observe ainsi des avortements quand les brebis sont infectées avant le 110^{ème} jour de gestation. (Storz, 1971, Buxton et al., 1990, Miller et al., 1990, Rodolakis et al., 1998, Aitken, 2000, Entrican et al., 2001, Andersen, 2004, OIE, 2005a, Sammin et al., 2005, Maley et al., 2008, Rocchi et al., 2008)

La mise bas prématurée ou à terme d'agneaux chétifs et normaux est due à la perturbation des sécrétions placentaires d'hormones stéroïdes et de prostaglandines causée par la placentite (Aitken, 2000, Entrican et al., 2001, Andersen, 2004, Rocchi et al., 2008). Toutes les brebis infectées lors d'une saison de mise bas donnée ne vont pas systématiquement développer de signes cliniques (Maley et al., 2008). La diversité des signes cliniques observés doit être liée à la virulence de la souche de *Chlamydomphila*, à la dose infectante, à la variabilité individuelle et au stade physiologique de l'hôte (Buxton et al., 1990, Papp et al. 1993, Rodolakis et al., 1998, Rocchi et al., 2008).

Il n'existe pas de lésion pathognomonique de la chlamydomphilose. Le placenta inflammé est recouvert d'un exsudat floconneux marron, les cotylédons peuvent être décolorés et nécrosés en profondeur, l'espace intercotylédonnaire est épaissi et oedémateux et peut présenter des hémorragies (Storz, 1971, Becerra et al., 1976, Chalmers et al, 1976, Buxton et al., 1990, Miller et al., 1990, Papp et al., 1996, Nietfeld, 2001, Sammin et al., 2005, Livingstone et al., 2008, Rocchi et al., 2008). Les agneaux expulsés peuvent avoir une apparence normale ou bien être recouverts d'un enduit crémeux jaunâtre lié à la nécrose du placenta, présenter de l'ascite, de l'œdème sous-cutané ou des pétéchies sur les muqueuses buccales, la langue, le tissu conjonctif sous-cutané et les organes internes, la plèvre et le péritoine (Storz, 1971, Chalmers et al, 1976, Aitken, 2000, Nietfeld, 2001). Une nécrose multifocale hépatique ainsi qu'une hypertrophie des nœuds lymphatiques de l'avorton sont aussi décrites (Becerra et al., 1976, Buxton et al., 1990, Sammin et al., 2005).

II. Transmission de l'infection

a) Excrétion autour de l'avortement par les femelles infectées

L'excrétion de *C. abortus* est massive dans le placenta et les eaux fœtales dans les deux jours suivant un avortement (Chalmers et al., 1976, Chalmers et al., 1997, Philips et Clarkson, 2002, Bouakane et al., 2005, OIE, 2005a). L'excrétion de *C. abortus* continue ensuite dans les sécrétions utérines pendant trois semaines (Papp et al., 1996, Nietfeld, 2001), dans les fèces pendant deux mois (Becerra et al., 1976), l'urine et le lait (Ongör et al., 2004). Les brebis qui avortent ou mettent bas des agneaux morts nés ou peu viables en avance ou en début de saison d'agnelage représentent donc une source majeure d'infection pour les brebis restant à mettre bas (Storz, 1971, Rodolakis et Souriau, 1980, Livingstone et al., 2008, Milne et al., 2008).

Les agneaux porteurs excréteront *C. abortus* dans le sperme pour les mâles (Rodolakis et Bernard, 1977), dans les produits du part et pourront avorter à leur tour lors de leur première ou seconde saison de reproduction en ce qui concerne les femelles (Wilsmore et al., 1990, Chalmers et al., 1997, Aitken, 2000, Nietfeld, 2001, Philips et Clarkson, 2002). Les agneaux peuvent aussi s'infecter en période périnatale au contact de leur mère naturelle ou adoptive si celle-ci est infectée. Ces agnelles constituent alors un réservoir infectieux : l'infection est latente et le titre en anticorps de ces agnelles est trop faible pour être détecté par les techniques de diagnostic usuelles (Wilsmore et al., 1984, Chalmers et al., 1997, Aitken, 2000).

b) Infections inapparentes

C. abortus pourrait subsister dans les tissus lymphoïdes d'un individu infecté (non gravide s'il s'agit d'une femelle) sous une forme immature ou peu voire non-infectieuse suite à la mise en place d'un équilibre du type « hôte-parasite » (Storz, 1971, Entrican et al., 2001). Les mécanismes aboutissant à la mise en place d'une infection persistante font appel à la production de cytokines, en particulier les INF- γ , et à l'activation de réactions biochimiques intracellulaires (activation de l'indoleamine-2,3-dioxygénase et carence en tryptophane) qui limitent la multiplication des *Chlamydophila* (Entrican, 2001, Caro et al., 2008, Rocchi et al., 2008).

Suite à un avortement, *C. abortus* peut persister au niveau de l'utérus, que les brebis soient gravides ou vides, avec des taux plus élevés en début de gestation (Michalopolou et al., 2007, Livingstone, 2008). Une brebis infectée en fin de gestation lors d'une saison de mise bas donnée peut ne pas déclarer de signes cliniques mais excréter tout de même *C. abortus* à la mise bas suivante (Rodolakis et Souriau, 1980, Wilsmore et al., 1990, Aitken, 2000, Nietfeld, 2001, Rekiki, 2002 et 2004, Bouakane, 2005).

L'introduction d'animaux infectés latents dans un troupeau immunologiquement naïf, comme lors d'achat d'agnelles de renouvellement infectées qui n'ont pas encore mis bas, présente un risque de contamination du cheptel par *C. abortus* (Chalmers et al, 1976, Chalmers et al., 1997, Aitken, 2000, Bouakane et al., 2005, Milne et al., 2008). Plus le nombre d'animaux infectés latents introduits est élevé, plus la probabilité de contaminer d'autres brebis par contact étroit est élevée et plus le pic d'avortements est précoce et prononcé (Milne et al., 2008).

III. Diagnostic

Un diagnostic de certitude de la chlamyphilose abortive ovine fait obligatoirement appel à des méthodes de diagnostic de laboratoire, les données épidémiologiques et cliniques ne donnant qu'une orientation dans le diagnostic différentiel des causes d'un avortement.

a) Indirect

Le diagnostic sérologique de la chlamyphilose n'est qu'un diagnostic de présomption : il ne permet pas de différencier un avortement dû à *C. abortus* d'un portage latent de *C. abortus* ou *pecorum* (Aitken, 2000, Rekiki, 2004, Gerber et al., 2007, Milne et al., 2008). D'autre part, le taux d'anticorps produits suite à un avortement reste très élevé jusqu'à la mise bas suivante, et on ne peut donc pas établir de diagnostic d'avortement précis en cas d'avortements successifs (Rodolakis et Souriau, 1980, Wilsmore, 1990, Livingstone et al., 2008). La sérologie ne permet pas non plus de distinguer les animaux vaccinés des animaux naturellement infectés (Borel et al., 2005, OIE, 2005a, Gerber et al., 2007). Les méthodes de diagnostic indirect ne sont donc optimisées que pour un diagnostic de troupeau dans un troupeau non vacciné, sur 10% des animaux avec un minimum de 10 animaux testés.

Le test de fixation du complément a été pendant longtemps la méthode de référence préconisée par l'Office International des Epizooties mais elle manque de sensibilité et de spécificité puisqu'elle ne permet pas de distinguer *C. abortus* de *C. pecorum*, voire d'autres bactéries G⁻ (Buzoni-gatel et Rodolakis, 1983, Rodolakis et al., 1998, OIE, 2005a, Berri et al., 2004). Ce manque de spécificité se retrouve aussi avec la plupart des tests ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) exception faite du kit Elisa-r (Pourquier, Montpellier, France) qui utilise un antigène recombinant spécifique de *C. abortus* (Rekiki, 2004, OIE, 2005a, Vretou et al., 2007, Wilson et al., 2008).

b) Direct

Les techniques d'isolement des *Chlamydophila* sur culture cellulaire, sur œuf embryonné ou sur souris ne sont pas applicables en routine car trop onéreuses et fastidieuses (Sherman et Jordan, 1985, Sayada et al., 1994, Rekiki, 2004). L'examen microscopique de frottis ou de calques de cotylédons après coloration de Stamp, Machiavello, Ziehel-Nielsen, Gimenez ou Giemsa entraîne souvent la confusion entre *Chlamydophila*, *Coxiella* et *Brucella* (Rodolakis et al., 1998, Nietfeld, 2001, OIE, 2005a). La mise en évidence d'antigènes de *Chlamydophila* par des techniques d'immunohistochimie [Immunofluorescence (IF), Fluorescence Antibody Test (FAT), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)], est plus spécifique que la bactérioscopie, plus sensible et plus rapide que l'isolement bactérien, mais leur coût reste trop élevé pour être utilisé en routine dans le diagnostic de la chlamydophilose. (Miller et al., 1990, Rodolakis et al., 1998, Andersen, 2004, Rekiki, 2004)

Le manque de sensibilité et de spécificité de ces techniques et des méthodes de diagnostic indirect de la chlamydophilose pousse le praticien à faire appel aux récentes avancées en biologie moléculaire. L'amplification génomique est la méthode de choix pour la détection de *Chlamydophila* [Polymerase Chain Reaction (PCR)] de par sa sensibilité très élevée et sa rapidité de mise en oeuvre. L'analyse du profil de restriction des fragments d'ADN amplifiés par simple PCR [Restriction Fragments Length Polymorphism (RFLP)] et l'utilisation d'amorces spécifiques pour cette amplification permettent de distinguer les différentes espèces de *Chlamydophila*. (Denamur et al., 1991, Meijer et al., 1997, Rodolakis et al., 1998, Everett et Andersen, 1999, Everett, 2000, Rekiki, 2004, OIE, 2005a, Corsaro et Greub, 2006)

Annexe 2 : Prise et conservation des échantillons de mucus vaginaux

Des prélèvements de cellules vaginales ont été effectués sur des brebis le jour de leur avortement ou quelques jours plus tard en introduisant dans le vagin des brebis des écouvillons vaginaux stériles constitués d'une tige fine plastique de 10 cm coiffée de coton sec. Ce type d'écouvillon est le plus indiqué pour l'isolement de *Chlamydiales* sur culture cellulaire (Mardh et Zeeberg, 1981, Mahony et Chernesky, 1985, Berri et al., 2004, Corsaro et Greub, 2006, Livingstone et al., 2008).

En règle générale, deux écouvillons vaginaux étaient effectués par brebis avortée.

Un premier écouvillon était effectué puis envoyé par colis postal à température ambiante dans un tube de prise de sang en verre stérile au laboratoire Scanelis (Toulouse, France) afin d'obtenir rapidement un résultat d'analyse PCR en temps réel spécifique de *C. abortus* (tests développés par Scanelis et utilisés en interne).

Les bactéries de l'ordre des *Chlamydiales* sont thermolabiles et doivent donc être conservées à très basse température pour conserver leur viabilité (Prentice et Farrant, 1977, Spencer et Johnson, 1983). Un second écouvillon vaginal était ainsi effectué pour être conservé à -160°C dans de l'azote liquide dans le but d'isoler ultérieurement *C. abortus* à l'INRA de Nouzilly (37). Pour ce faire, le centre d'insémination artificielle OVITEST COOP (Onet Le Château, 12) avait généreusement mis à notre disposition un réservoir cryogénique d'azote liquide (référence : 01449488). La tête de l'écouvillon vaginal est conditionnée dans un tube de prise de sang stérile en verre coiffé d'un bouchon en caoutchouc ou dans le tube en plastique contenant initialement l'écouvillon. Les tubes sont placés dans des canisters en aluminium et maintenus quelques minutes dans les vapeurs d'azote avant d'être immergés lentement dans la phase liquide (Sherman et Jordan, 1985). Les laps de temps entre l'avortement, le prélèvement et le dépôt dans le réservoir cryogénique sont réduits au maximum.

Les échantillons ont été envoyés à l'INRA par transporteur dans un colis contenant des sticks de glace carbonique à - 60°C. Après réception du colis, les échantillons ont été aliquotés et conservés dans un congélateur électrique à - 75°C.

Annexe 3 : Isolement sur culture cellulaire et dénombrement des *C. abortus* par la technique des plages de lyse.

- Préparation des cultures cellulaires

Des cellules Mc Coy (lignée de cellules synoviales humaines) sont cultivées dans des flacons en plastique de 75 cm² de surface de culture pour les cellules adhérentes et contenant du milieu nutritif MR 1X supplémenté à 2,5% par du sérum de veau fœtal (Banks et al., 1970).

Le milieu MR 1X est un milieu de culture cellulaire de Eagle modifié répondant bien aux exigences de la cellule hôte pour assurer une bonne multiplication des *C. abortus*. Il s'agit d'un milieu de culture salin équilibré auquel des acides aminés essentiels et des vitamines ont été ajoutés. Le sérum de veau fœtal est une source de protéines supplémentaire qui va contribuer à la stabilisation du pH du milieu (Spencer et Johnson, 1983).

Le milieu MR 1X contient, pour un volume final de 2000 mL, 200 mL de solution saline d'Earle (concentration x 10), 10 g d'hydrolysate de lactalbumine, 2 g d'extrait de levure, 2,8 g de NaHCO₃, 7,3 g de glucose, 40 mL d'acides aminés (milieu minimum d'Eagle concentration x 50), 20 mL de vitamines (milieu minimum d'Eagle concentration x 100), 20 mL de glutamine (200 mM, x 100) et 20 mL de pyruvate de sodium (100 mM, x 100). (Banks et al., 1970, Rodolakis et Chancerelle, 1977). Le volume est ajusté à deux litres avec de l'eau ultra pure.

Le milieu MR 2X correspond au même milieu de culture mais deux fois plus concentré.

Après trypsination classique (trypsine-PBS 0,125%), on récupère le tapis cellulaire ainsi détaché de la surface de chaque flacon dans 4 ou 5 mL du milieu de croissance. On prend 6mL de cette suspension que l'on place dans 100mL de milieu MR 1X supplémenté avec 2,5% de sérum de veau fœtal. On distribue 2 mL de la solution obtenue par cupule de plaque P6 (plaque à 6 puits ; Falcon, Becton Dickinson, Lab ware, Franklin lakes, USA). Les plaques sont mises à l'étuve à 37°C avec 5% de CO₂ jusqu'à utilisation (Johnson et al., 1983).

- Inoculation des cultures cellulaires à partir des écouvillons vaginaux

- Préparation des inoculum

Sous hotte à flux laminaire, les écouvillons vaginaux sont placés après décongélation dans des tubes à essais stériles. On y ajoute 1mL de tampon SPG (tampon saccharose-phosphate-glutamate) contenant 0,25% de gentamycine et 1% de fungizone pour éliminer les contaminants bactériens et fongiques (Reeve et al., 1975, Everett, 2000). *C. abortus* est naturellement résistante aux aminosides. Le contenu du tube est homogénéisé par agitation à l'aide d'un vortex et le liquide est aspiré pour être déposé dans un cryotube qui sera placé et conservé à - 80°C dans un congélateur après l'inoculation du tapis de cellules.

Le tampon SPG est un milieu de transport et de conservation des *Chlamydomphila* vivantes (Spencer et Johnson, 1983). Il correspond au tampon PBS de pH 7,6 auquel on ajoute 150 g de saccharose et 1,44 g d'acide glutamique pour 2 L d'eau distillée (Spencer et Johnson, 1983, Miller et al., 1990).

Les phases de refroidissement et de réchauffement des échantillons, ainsi que la préparation des inoculum pour mise en culture cellulaire sont réduites au maximum pour optimiser la survie des *Chlamydomphila* (Prentice et Farrant, 1977).

- Inoculation des cultures cellulaires

Sous hotte à flux laminaire, on dilue le mucus vaginal au dixième en ajoutant 900 µL de solution PBS contenant 1% de di-éthyl-amino-éthanol dextran (DEAE) à 100 µL du surnageant dans un tube à essai stérile. Le DEAE inverse les charges électriques pour faciliter l'adhésion des *Chlamydomphila* aux membranes cellulaires.

On effectue de même une dilution au centième des mucus vaginaux dont la concentration en *Chlamydomphila* est estimée par PCR à 10^4 Chl/mL, et une dilution au millième des mucus vaginaux dont la concentration en *Chlamydomphila* est estimée par PCR à 10^5 Chl/mL ou non testés. La même opération est répétée avec quatre témoins négatifs.

On prélève 0,2 mL de mucus vaginaux dilués du dixième au millième pour les placer en duplicata dans les cupules de plaques P6 (Rekiki et al., 2002). Les plaques sont mises à l'étuve pendant 2h à 37°C sous atmosphère de CO₂ (5%), le temps que les bactéries se lient aux membranes cellulaires et pénètrent dans les cellules. (Banks et al., 1970, Rodolakis et Chancerelle, 1977, Rekiki et al., 2002)

L'inoculum est ensuite aspiré et on ajoute environ 2 mL de milieu nutritif semi solide extemporanément préparé (mélange de 40 mL de MR 2X, 50 mL d'Agar noble, 10 mL de sérum de veau fœtal, 1 mL de fungizone et 0,25 mL de gentamycine) dans chaque cupule. Ce milieu nutritif contient de l'Agar pour obtenir un milieu gélatineux autour des cellules. Ainsi, lors de la libération des corps élémentaires de *Chlamydomphila*, les cellules seront détruites de proche en proche, ce qui se manifestera par la formation de plages de lyse dans l'agar.

Les plaques sont placées une semaine dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂ sous atmosphère humide pour éviter la dessiccation des cellules. (Banks et al., 1970, Rodolakis et Chancerelle, 1977, Johnson et al., 1983)

Au bout de sept jours, on rajoute 1 mL de milieu nutritif semi solide et les plaques sont de nouveau replacées à l'étuve pour une semaine. (Banks et al., 1970, Rodolakis et Chancerelle, 1977, Rodolakis et Souriau, 1992)

- Lecture des plages de lyse

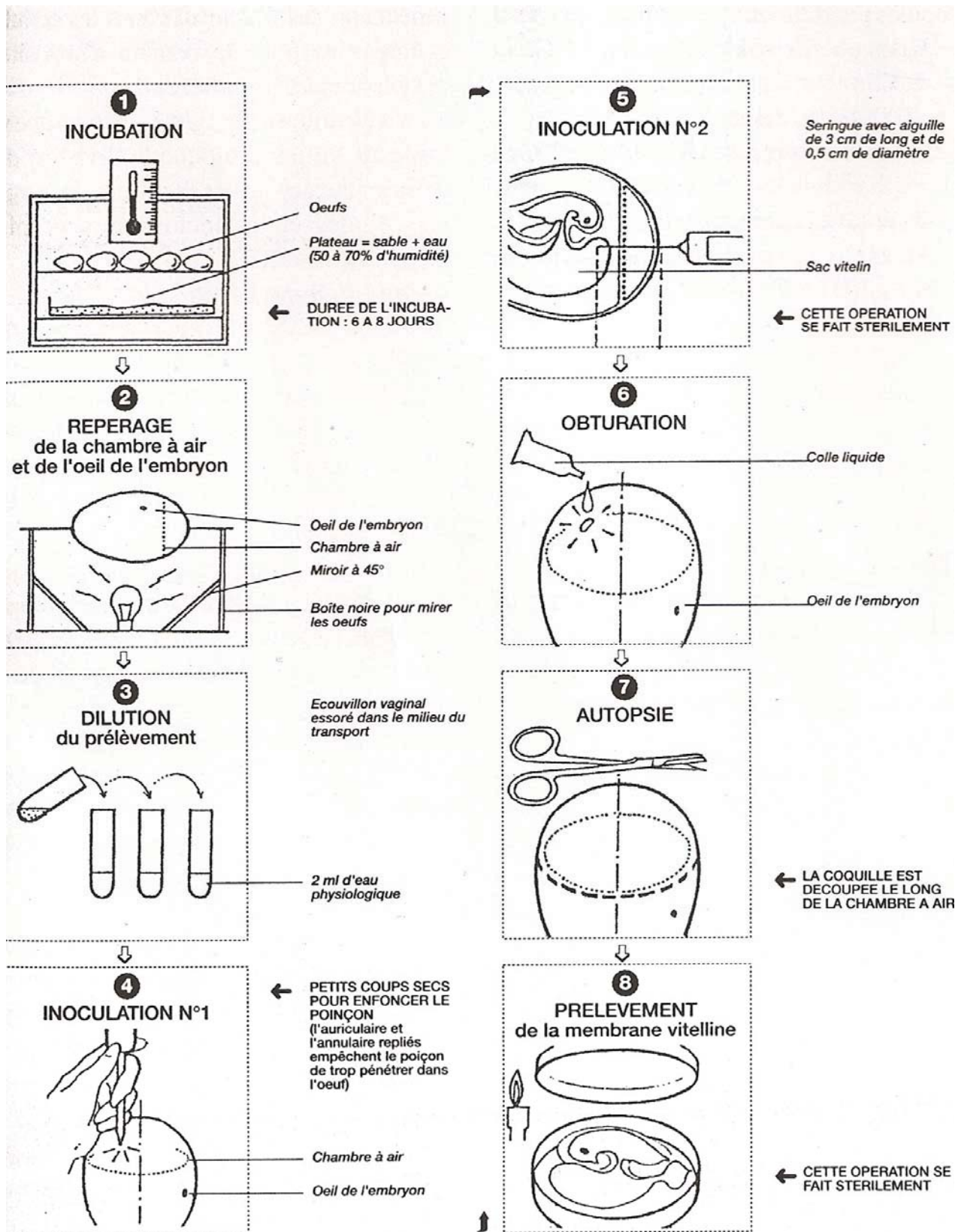
Au 14^{ème} jour après inoculation, on rajoute dans chaque cupule 1 mL du mélange composé par 100 mL d'agar noble, 100 mL d'eau physiologique et 3 mL de rouge neutre à 1% qui va permettre de visualiser les plages de lyse (Banks et al., 1970, Rodolakis et Chancerelle, 1977). Le rouge neutre colore les cellules vivantes et on distingue alors des disques non colorés sur les cupules qui correspondent aux cellules tuées lors de la multiplication des *Chlamydomphila*.

Les plaques sont placées à l'étuve une journée.

Le lendemain, on compte le nombre de plages de lyse obtenues sur les cultures cellulaires aux différentes dilutions. L'observation d'une seule plage de lyse est suffisante pour conclure à la présence de bactéries vivantes dans l'inoculum de départ. Par une règle de trois, on détermine la concentration en bactéries dans l'inoculum de départ en fonction du

nombre de plages de lyses obtenues sur les cupules correspondant à la dilution maximale de l'inoculum.

Annexe 4: Isolement des *Chlamydia* sur œuf embryonné. Protocole d'inoculation des œufs.
[d'après Rodolakis et Souriau, 1997]



- Incubation des œufs

C. abortus est mise en culture sur des œufs embryonnés de poules Leghorn exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS). Ces œufs proviennent de la Plateforme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE) de l'INRA de Nouzilly et sont garantis indemnes de mycoplasmes et du virus de la Leucose aviaire.

Les œufs sont incubés dans une couveuse à atmosphère humide dont on règle la température à 36°C. Au septième jour suivant l'incubation, les œufs sont mirés et triés pour ne garder que les œufs embryonnés vivants. Si l'œuf est fécondé et l'embryon vivant, on peut distinguer son œil et des vaisseaux sanguins. La chambre à air et l'œil de l'embryon sont repérés par transparence et leurs positions sont marquées au crayon sur la coquille.

- Inoculation des œufs

Les mucus vaginaux ayant permis l'obtention de plages de lyse sont sélectionnés pour inoculer des œufs embryonnés. Sous hotte à flux laminaire, on dilue ces mucus de moitié avec du tampon SPG. On prélève 200 µL de cette dilution et on y ajoute 800 µL de tampon pour obtenir une dilution au dixième.

On applique une goutte de teinture d'iode au niveau de la chambre à air de l'œuf, à l'opposé de l'œil de l'embryon, et on y perce un trou à l'aide d'un poinçon préalablement passé dans de l'alcool à 70°C.

Chaque œuf est ensuite inoculé par 0,2 mL d'une dilution grâce à une seringue à insuline et à une aiguille de 0,6*25 mm (BD Microlance 3). L'inoculum est injecté dans la vésicule vitelline de l'embryon (Rodolakis, 1976a). *C. abortus* infecte ensuite les cellules de la membrane vitelline et s'y multiplie.

On applique enfin une goutte de teinture d'iode au niveau du trou que l'on obstrue avec du vernis à ongle avant de replacer les œufs dans l'incubateur.

Des séries d'œufs supplémentaires sont inoculées de la même manière avec les bactéries isolées par culture cellulaire ou par une première culture sur œuf embryonné. Les degrés de dilution des inoculums sont déterminés en fonction de leur concentration en *C. abortus*.

- Autopsie des œufs

Les embryons morts dans les quatre premiers jours après inoculation sont éliminés. Ensuite, on mire les œufs deux fois par jour et on autopsie ceux qui meurent à partir de cinq jours post-inoculation dans le but de récupérer leurs membranes vitellines (Rodolakis, 1976a).

Sous hotte à flux laminaire, la zone correspondant à la chambre à air est badigeonnée d'iode et découpée à l'aide de ciseaux passés dans l'alcool à 90°. L'embryon et ses annexes sont versés dans une boîte de pétri stérile. La membrane vitelline est prélevée et déposée dans un flacon stérile puis conservée à 4°C au réfrigérateur.

Grâce à une pipette pasteur stérile, un dépôt de l'extraction est étalé sur une gélose au sang de mouton ou au milieu LB (composition par litre du milieu LB : 10g de peptone, 5g d'extrait de levure, 10g de NaCl, pH ajusté à 7,5 avec du NaOH). La gélose est placée à l'étuve à 37°C pendant 24h. Le lendemain on constate la présence ou non de colonies bactériennes contaminantes sur les géloses. Les membranes vitellines contaminées sont éliminées.

- Broyage des membranes vitellines

Les membranes non contaminées sont broyées individuellement, ou en pool si les œufs ont été inoculés avec la même souche, avec une pincée de sable de Fontainebleau stérile et 1 mL d'eau physiologique par membrane (Rodolakis, 1976a). Le tout est centrifugé 20 min à 1800 g, à 4°C, pour obtenir un surnageant contenant *C. abortus* et un culot comprenant les débris cellulaires, le sable et éventuellement des bactéries contaminantes. Le surnageant de centrifugation est conservé au congélateur à -75°C dans des cryotubes de 1 mL.

Annexe 5 : Identification de *C. abortus* par PCR et RFLP.

- Extraction d'ADN

L'ADN des surnageants de broyats de membranes vitellines est extrait à l'aide du kit QIAmp DNA Mini Kit (Quiagen, Courtaboeuf, France), sous hotte à flux laminaire (Berri et al., 2004).

Dans des tubes Eppendorf, 200 µL de tampon de lyse tissulaire ATL et 20 µL de protéinase K sont mis en présence de 50 µL de chaque surnageant. Le tout est mis à incuber trente minutes à 67°C. On rajoute ensuite 200 µL de tampon ATL et on remet les échantillons à incuber 10 minutes à 67°C.

On ajoute 200 µL d'éthanol pur et on transvase chaque échantillon sur une colonne Qiagen. On centrifuge la colonne une minute à 10 000 tours/min à 20°C. Si toute la phase liquide n'est pas passée à travers le filtre, on réitère l'opération.

La colonne est posée sur un nouveau tube et lavée avec 500 µL de tampon AW1, puis centrifugée une minute à 10 000 tours/min. La colonne est de nouveau posée sur un autre tube et lavée avec 500 µL de tampon AW2, puis centrifugée trois minutes à 15 000 tours/min. Si le tampon n'est pas totalement élué, on centrifuge de nouveau la colonne une minute à 15 000 tours/min.

Dans un tube Eppendorf, on ajoute à la colonne 150 µL de tampon AE, et on le laisse cinq minutes à température ambiante.

On centrifuge le tube deux minutes à 15 000 tours/min et on récupère le culot de centrifugation contenant l'ADN purifié élué dans un tube Eppendorf stérile. Les tubes sont conservés à 4°C si on lance rapidement une PCR ou sont placés à -20°C si on compte la faire ultérieurement.

- Amplification du génome de *C. abortus* par PCR

- Principe

Le principe de la PCR est d'utiliser de manière répétitive l'activité d'une ADN polymérase thermostable à 94°C, la Taq polymérase (isolée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*, Gibco-Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.), pour copier

la séquence d'ADN à amplifier. L'ADN cible est dénaturé par traitement thermique. L'hybridation d'amorces nucléotidiques avec les séquences situées en 3' et en 5' du gène à amplifier sert de base à l'enzyme pour synthétiser la séquence d'ADN complémentaire de l'ADN cible entre ces amorces. Au dessus d'un seuil de 35 cycles d'amplification, la concentration en fragments d'ADN amplifiés est suffisante pour être visualisée à la lumière ultraviolette après marquage et électrophorèse sur gel d'agarose.

- Amorces 16S et 23R

Les amorces 16S et 23R permettent d'amplifier l'espace intergénique 16S-23S, les gènes 16S et 23S codant pour les sous-unités ribosomales 16S et 23S (Meijer et al., 1997, Everett et Andersen, 1999, Everett, 2000). Ces gènes sont très conservés parmi les différentes souches de *Chlamydomophila* (Meijer et al., 1997, Everett, 2000, Rekiki, 2004). La taille des amplicons obtenus après amplification de l'espace intergénique 16S-23S par Everett et Andersen en 1999 s'élevait à 585 pb pour *Chlamydomophila*.

Séquence de l'amorce 16S : 5'-CTT-GAC-TTT-GTA-GAA-TCA-T-3'

Séquence de l'amorce 23R : 5'-AAA-AGG-CAC-GCC-GTC-AAC-C-3'

- Amorces CTL et CTU

Le gène *ompA* code pour la protéine MOMP (Major Outer Membran Protein), protéine majeure de la membrane externe des *Chlamydiaceae*. Il est spécifique des *Chlamydiaceae* et est très conservé au sein de cette famille (Meijer et al., 1997, Rodolakis et al, 1998, Everett, 2000). Les amorces CTL et CTU permettent l'amplification sur environ 1,1 kb d'une séquence de ce gène (Denamur et al., 1991, Sayada et al., 1994 et 1995).

Séquence de l'amorce CTL : 5'-CAA-GAT-TTT-TCT-AGA-TTT-CAT-TCT-TTG-TT-3'

Séquence de l'amorce CTU : 5'-ATG-AAA-AAA-CTC-TTG-AAA-TCG-G-3'

- Méthode

- Amplification de l'ADN cible

Pour chaque échantillon à tester, un mélange réactionnel de 22,5 µL est préparé dans la salle d'amplification. Il contient 0,1 µL de Taq polymérase (Concentration finale Cf : 0,02 mM), 5 µL de tampon 5X, 2,5 µL de chaque amorce (Cf : 1 µM), 2,5 µL de MgCl₂ (Cf : 2,5 mM), 2,5 µL de dNTPs (désoxy-ribo nucléotides tri-phosphates dATP, dCTP, dGTP et dTTP, Cf : 0,2 mM) et 7,4 µL d'eau physiologique (Berri et al., 2004). On incorpore 3 µL de solution contenant l'ADN cible à 22 µL de ce mélange réactionnel.

La réaction d'amplification du génome à partir des amorces 16S et 23R est effectuée dans un thermocycleur selon le programme suivant. La première étape de la PCR consiste en la dénaturation de l'ADN double brin natif à 94°C pendant 10 min. Une succession de 35 cycles d'amplification s'ensuit. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 30 s, une étape d'hybridation des amorces à 60°C pendant 30 s et une étape d'élongation de l'ADN monocaténaire complémentaire à partir des amorces par la Taq polymérase à 72°C pendant 1 min. Après ces 35 cycles, une élongation finale se produit à 72°C pendant 10min.

Le programme pour amplification du génome à partir des amorces CTL et CTU suit les mêmes étapes mais à des températures et des durées différentes. L'ADN est dénaturé à 94°C pendant 5 min. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 30 s, une étape d'hybridation des amorces à 50°C pendant 1 min et une étape d'élongation de l'ADN monocaténaire complémentaire à 72° pendant 1 min 30 s (Everett et Andersen, 1999, Berri et al., 2004). Après 36 cycles, l'élongation finale se produit à 72°C pendant 7 min.

Le thermocycleur se règle enfin à 4°C, température de conservation des produits de PCR.

- Analyse des amplicons

La séparation des fragments d'ADN amplifiés de l'ADN total se fait par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%. Le gel d'agarose est préparé en dissolvant 1,2-1,5 g d'agarose pure dans 80-100 mL de tampon TBE 0,5X (Tris Borate EDTA). Le tampon TBE

est une solution à pH 8,3 composée de 108 g/L de Tris base, 55 g/L d'acide borique et 40 mL/L d'EDTA-Na.

On rajoute ensuite 1 µL de bromure d'éthidium (BET) qui est un agent intercalant des bases nucléotidiques qui permet de visualiser l'ADN sous lumière ultra violette.

Le tout est déversé dans un bac avec un râtelier pour former des puits et laissé 20 min à température ambiante pour la prise en masse du gel. Le gel d'agarose est ensuite déposé dans une cellule d'électrophorèse dans un bain de tampon TBE 0,5X.

Dix microlitres de chaque mélange réactionnel contenant les séquences d'ADN *C. abortus* amplifiées sont déposés dans chaque puit. Il en est de même pour les témoins négatifs et positifs. Le premier puit est consacré à 2 µL de marqueur de taille d'ADN Exp 1/12 (marqueur de taille de 100 en 100 paires de bases, entre 0 et 1200 pb). La migration des fragments d'ADN s'effectue de la borne négative à la borne positive de la cellule d'électrophorèse en 30 min à 100 V.

Le témoin positif est représenté par une souche *C. abortus* préalablement identifiée et cultivée sur cellules ou sur œufs embryonnés (Tabl. 12).

Le témoin négatif est constitué par le mélange réactionnel seul.

Souches	Origine	Hôte	Signes cliniques associés
<i>C. abortus</i> :			
AB 7	Aveyron	Brebis	Avortement
AB 22	Aveyron	Brebis	Avortement
Vaccin CEVAC Chlamydia 1B			
AC 1	Yvelines	Chèvre	Avortement
<i>C. pecorum</i> :			
iB 4	France	Brebis	Animal sain
AB 10	Indre et Loire	Brebis	Avortement
M 14	Maroc	Chèvre	Avortement

Tableau 12 : Caractéristiques des souches utilisées comme témoins positifs de PCR

La lecture des migrations des amplicons sur gel d'agarose se fait par exposition du gel une ou deux secondes à la lumière ultra violette (FluorChem 8900).

- Etude du profil de restriction des produits amplifiés par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Les séquences d'ADN amplifiées par PCR sont soumises à une digestion enzymatique par des endonucléases de restriction. On obtient ainsi des fragments d'ADN de différentes tailles et l'ensemble de ces fragments forme un profil de restriction spécifique du genre et de chaque espèce de *Chlamydomphila*. On peut alors distinguer *C. abortus* de *C. pecorum* et des autres bactéries de la famille des *Chlamydiaceae* (Denamur et al., 1991, Rodolakis et Souriau, 1992, Meijer et al., 1997, Rodolakis et al., 1998, Everett et Andersen, 1999, Sayada et al., 1995). Les profils de restriction obtenus à partir de souches *C. pecorum* peuvent présenter des variantes mais les souches *C. abortus* sont caractérisées par un profil électrophorétique unique (Denamur et al., 1991, Rodolakis et Souriau, 1992, Rekiki, 2002 et 2004).

Les amplicons du gène *ompA* sont digérés par l'enzyme *Alu I* (Denamur et al., 1991, Sayada et al., 1994 et 1995, Berri et al., 2004) et les produits de l'amplification de l'espace intergénique 16S-23S peuvent l'être par les enzymes *Pst I* ou *Bgl II* (Meijer et al., 1997, Rekiki et al., 2002, Berri et al., 2004).

Un mélange réactionnel de 20 μL est préparé à partir de 5 à 15 μL de produit PCR contenant les séquences d'ADN amplifiées, 2 μL de tampon II à 10%, 1 μL d'enzyme de restriction et le complément en eau physiologique. Le tout est placé trois heures dans un thermocycleur à 37°C. (Berri et al., 2004)

Les fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% supplémenté en bromure d'éthidium et révélés à la lumière ultraviolette (Rekiki et al., 2002, Berri et al., 2004).

Annexe 6 : Utilisation d'un modèle murin pour déterminer l'efficacité du vaccin vivant thermosensible contre *C. abortus*.

- Origine et conditions d'élevage des souris

Les souris utilisées pour cette expérimentation sont des souris non consanguines albinos de lignée OF1 (Oncins France, souche 1), exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (Bouakane, 2005).

L'expérimentation sur les souris a lieu dans une animalerie de niveau 2 de la Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale du centre INRA de Nouzilly. L'humidité relative et la température de l'air de l'animalerie sont respectivement fixées à 60% et 19°C et sont contrôlées toutes les semaines (Rodolakis, 1976a). La photopériode est contrôlée : la salle est éclairée par des néons pendant 12h par jour. L'accès à cette animalerie se fait en traversant plusieurs sas, selon le principe de la marche en avant.

Dans un premier temps, les souris sont placées dans des cages par vingt sur sciure stérile avec eau et nourriture à volonté, puis en cage individuelle après l'inoculation. Elles reçoivent de l'eau et une alimentation standard à base de bouchons stérilisés pour rongeurs, à volonté (Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France). A la fin de l'expérimentation, les souris sont euthanasiées par gazage au CO₂. Les cages sont disposées sur les portoirs de telle sorte que les souris les plus contaminées soient toujours situées à un étage inférieur aux souris les moins contaminées et aux souris non infectées. On évite ainsi la contamination de souris saines ou peu infectées par le biais des déjections des souris fortement contaminées.

- Vaccination des souris

Des souris femelles OF1 (de huit semaines, 20 g) sont vaccinées par voie sous cutanée en région dorsale avec 0,2 mL de vaccin CEVAC ChlamydiaND. Un autre lot de souris n'est pas vacciné.

- Inoculation des souris par *C. abortus* et suivi de la survie des souriceaux.

Des souris femelles sont mises à la reproduction dans des cages par trois en présence d'un mâle pendant trois jours. Les mâles appartiennent à la même lignée OF1. La saillie des souris est confirmée par la présence de bouchons vaginaux. (Rodolakis, 1976a, Bouakane, 2005)

A mi gestation, soit à 10 ± 1 jours après la séparation des mâles et des femelles, les souris sont pesées pour trier les souris gravides et les répartir en lots. Des souris gravides sont inoculées par voie intrapéritonéale avec 0,2 mL de la souche *C. abortus* à tester à la dose 10^6 , 10^5 ou 10^4 bactéries/souris. D'autres souris sont inoculées avec différentes concentrations de la souche de référence *C. abortus* AB 7. Un lot témoin de gestation est constitué par des souris gravides non inoculées. (Rodolakis, 1976a, 1983, Rekiki et al., 2003, Berri et al., 2004)

Les souris sont ensuite pesées quotidiennement pour vérifier qu'elles n'ont pas avorté et mangé leurs petits (Rodolakis, 1976a, 1983, Rekiki et al., 2003). Un avortement peut aussi être soupçonné lors de la présence de souillures plus ou moins hémorragiques au niveau de la vulve (Rodolakis, 1976a). Les conséquences d'une infection des souris par *C. abortus* sont mesurées à l'aide du dénombrement quotidien des souriceaux vivants par portée la semaine suivant le part (Rodolakis, 1976a, 1983, Rekiki et al., 2003). Le taux de survie des souriceaux est en effet inversement proportionnel au niveau d'infection *in utero* et *post partum* (Rodolakis et al., 1981, Buzoni-Gatel et Rodolakis, 1983).

Annexe 7 : Mise en évidence de la présence d'anticorps sériques anti *C. abortus* chez des souris vaccinées à l'aide du kit de diagnostic rapide Chekit™

Un prélèvement sanguin est effectué sur les souris au niveau du sinus rétro-orbital à l'aide de micropipettes stériles à usage unique la veille de l'inoculation et quatorze jours plus tard. Le sang est conditionné dans des tubes Eppendorf stériles de 2 mL et laissé une nuit à température ambiante afin qu'il coagule. Les tubes de sang sont centrifugés 5 min à 2000 tours/min et 50 µL de sérum est déposé dans un nouveau tube Eppendorf stérile.

Une microplaque sensibilisée Chekit contenant 96 puits, dont 4 sont destinés aux témoins positifs et négatifs, permet de tester 92 sérums. Un microlitre de sérum est déposé par puit contenant 99 µL de tampon de dilution B₁-Sample (dilution 1/100). La microplaque est mise à incuber 1h à 37 ± 2°C à l'étuve pour permettre l'adsorption des anticorps murins aux antigènes *C. abortus* situés au fond des cupules. Trois lavages de la plaque sont ensuite effectués avec 300 µL de solution de lavage PBS Twin 10% par cupule.

Cent microlitres de conjugué anti-IgG (Immunoglobulines) souris dilué au millième sont distribués par puit. La plaque est remise à incuber 1h à 37 ± 2°C pour permettre la fixation des anticorps anti-IgG souris aux anticorps murins. Trois lavages de la plaque sont effectués avec 300 µL de solution de lavage PBS Twin 10% par cupule.

La formation du complexe antigène *Chlamydomphila* - anticorps murin - anticorps anti-IgG souris est révélée par une réaction de déphosphorylation par la phosphatase alcaline couplée aux anticorps anti-IgG souris. Le substrat, le para-nitro-phénol-phosphate (pNPP), est clivé en en para-nitro-phénol (pNP) de coloration jaune. Deux cent microlitres de substrat pNPP, préparé auparavant en dissolvant 4 pastilles de pNPP à 5 mg/mL dans 20 mL de tampon pNPP, sont ajoutés à cet effet par cupule. La microplaque est laissée une demie heure à l'obscurité afin d'éviter toute coloration non spécifique. La réaction de déphosphorylation est stoppée par ajout de 50 µL par puit de NaOH (Cf : 3M).

La coloration jaune, et donc la présence d'anticorps murins anti-*Chlamydomphila abortus* dans le sérum testé, est ensuite analysée avec un spectrophotomètre réglé sur 414 nm à l'aide du logiciel Genesis. Cette méthode permet de déterminer la densité optique des solutions contenues dans les cupules. Cette densité est d'autant plus élevée que des complexes antigène *Chlamydomphila* - anticorps murin - anticorps anti-IgG souris se sont formés dans les puits. On calcule alors la densité optique moyenne des deux témoins positifs et négatifs et le

ratio densité optique relative de l'échantillon sur densité optique relative moyenne des témoins positifs S/P (Sample optic density/Positive optic density) selon la formule suivante :

$$S/P = (DO \text{ Ech} - D\text{Om CN}) / (D\text{om CP} - D\text{om CN})$$

Avec DO Ech: densité optique de l'échantillon

D_{Om} CN: densité optique moyenne des contrôles négatifs

D_{Om} CP: densité optique moyenne des contrôles positifs

Ce ratio S/P, multiplié par 100, donne le titre en anticorps anti- *Chlamydomphila abortus* des sérums de départ. Le test ELISA ne peut être validé que si D_{Om} CP > 0,400 et D_{Om} CP > 2 x D_{Om} CN. Les résultats sont interprétés par extrapolation des critères établis pour les ruminants aux souris (Tabl. 13).

Titre en anticorps	Interprétation
Titre < 40	négatif
40 < titre < 100	positif +
100 < titre < 200	Positif ++
200 < titre < 300	Positif +++
Titre > 300	Positif ++++

Tableau 13: Interprétation des tests ELISA Chekit-*Chlamydomphila* souris

Annexe 8: Résultats de la première mise en culture sur œufs embryonnés des souches *C. abortus* isolées.

N° œuf	Inoculum	Dilution	Observations	Bct	Souche	Résultat PCR	Concentration
15 171	écouvillon 4030 GAEC du Moulin	1/2	éliminé		15 172 AB 21	N et P	10 ⁵ Chl/mL
15 172		1/2					
15 173		1/10					
15 174		1/10	vitellus vert				
15 175		1/10	éliminé				
15 176		1/10	fœtus et membrane gros				
15 177		1/10					
15 178		1/10	éliminé				
15 179	écouvillon 4118 GAEC des Mazes	1/2	vivant		15 181 AB 22	N	3.10 ⁷ Chl/mL
15 180		1/2	éliminé		15 181 AB 22	N	
15 181		1/10	belle membrane				
15 182		1/10	éliminé				
15 183		1/10	très belle membrane				
15 184		1/10	vivant				
15 185		1/10	éliminé				
15 186		1/10	vivant				
15 187	écouvillon 5086 GAEC des Mazes	1/2	contaminé	+			15 187 AB 22
15 188		1/2	contaminé		15 187 AB 22		
15 189		1/10	membrane vitelline compacte	+			
15 190		1/10	éliminé				
15 191		1/10	contaminé	+			
15 192		1/10	éliminé				
15 193		1/10	contaminé	+			
15 194		1/10	membrane laide				
15 195	écouvillon 5083 GAEC des Mazes	1/2	éliminé	?			
15 196		1/2	éliminé	?			
15 197		1/10	éliminé	?			
15 198		1/10	éliminé	?			
15 199		1/10	éliminé	?			
15 200		1/10	éliminé	?			
15 201		1/10	éliminé	?			
15 202	15 017		vivant, membrane laide		15 202 AB 22		
15 203	écouvillon 7015 GAEC du Moulin	1/2	contaminé	+	15 209 AB 21		
15 204		1/2	éliminé	?	15 209 AB 21		
15 205		1/10	éliminé	?			
15 206		1/10	éliminé	?			
15 207		1/10	éliminé	?			
15 208		1/10	contaminé	+			
15 209		1/10	contaminé	+			
15 210		1/10	contaminé	+			
15 211	écouvillon 9028 GAEC du Moulin	1/2	éliminé	?			
15 212		1/2	éliminé	?			
15 213		1/10	éliminé	?			
15 214		1/10	éliminé	?			
15 215		1/10	éliminé	?			
15 216		1/10	éliminé	?			
15 217		1/10	éliminé	?			
15 218		1/10	éliminé	?			

N° œuf	Inoculum	Dilution	Observations	Bct	Souche	Résultat PCR	Concentration
15 219	écouvillon 6073 GAEC Aubépine	1/2	éliminé	?			
15 220		1/2	éliminé	?			
15 221		1/10	éliminé	?			
15 222		1/10	éliminé	?			
15 223		1/10	éliminé	?			
15 224		1/10	éliminé	?			
15 225		1/10	éliminé	?			
15 226		1/10	éliminé	?			
15 227	plage 4030 GAEC du Moulin		contaminé	+	15 228 AB 21	N et P	10 ⁵ Chl/mL
15 228			membrane très peu vascularisée				
15 229			contaminé car cassé, vivant, membrane	+			
15 230			pâteuse		15 230 AB 21	N	
15 231			vivant				
15 232	plage 4118 GAEC des Mazes		membrane épaisse				
15 232			vivant		15 232 AB 22		4.10 ⁷ Chl/mL
15 233					15 233 AB 22		
15 234			vivant, membrane se délite		15 234 AB 22		
15 235			belle membrane		15 233 AB 22		
15 236		petit fœtus, membrane très épaisse		15 236 AB 22			
15 237	plage 5086 GAEC des Mazes				15 237 AB 22	N	
15 238			vivant, membrane pâteuse		15 238 AB 22		
15 239			vivant, membrane laide		15 238 AB 22		
15 240			belle membrane		15 240 AB 22	N	
15 241			vivant, membrane pâteuse		15 238 AB 22		
15 242	plage 5083 GAEC des Mazes		vivant		15 234 AB 22		
15 243					15 243 AB 22	N	
15 244			grosse membrane		15 244 AB 22		
15 245			membrane verdâtre et pâteuse		15 244 AB 22		
15 246			petit fœtus		15 246 AB 22		
15 247	plage 7015 GAEC du Moulin		vivant		15 247 AB 21	N	
15 248			belle membrane		15 248 AB 21	N et P	10 ⁴ Chl/mL
15 249			vivant, membrane verdâtre		15 247 AB 21	N	
15 250			petit fœtus, grosse membrane, vaisseaux très rouges		15 250 AB 21	N et ?	
15 251			belle membrane		15 251 AB 21	N et P	10 ⁵ Chl/mL
15 252	plage 9028 GAEC du Moulin		éliminé	?			
15 253			éliminé	?			
15 254			éliminé	?			
15 255			éliminé	?			
15 256			éliminé	?			
15 257	plage 6073 GAEC Aubépine		vivant, membrane pâteuse		15 257 AB 23	N	
15 258			très grosse membrane pâteuse		15 258 AB 23	N	
15 259			très belle membrane		15 259 AB 23	N	
15 260					15 258 AB 23	N	
15 261			allantoïde rouge		15 261 AB 23	N	
15 262	15 016		éliminé				
15 263			membrane se délite		15 263 AB 22	N	
15 264	15 014		belle membrane		15 264 AB 22	N	
15 265			membrane se délite				
15 266	15 017		belle membrane		15 263 AB 22	N	

Annexe 9: Résultats de la seconde mise en culture sur œufs embryonnés des souches *C.abortus* isolées.

N° œuf	Inoculum	Dilution	Observations	Bct	Souche	Résultat PCR	Concentration			
15 267	15 248 AB 21	1/2	petite membrane		15 267 AB 21	N				
15 268		1/2	embryon blanchâtre		15 268 AB 21	N				
15 269		10 ⁻¹	éliminé		15 270 AB 21	N				
15 270		10 ⁻¹	membrane laide							
15 271		10 ⁻¹	membrane épaisse							
15 272		10 ⁻¹	éliminé		15 273 AB 21					
15 273		10 ⁻¹	tué, grosse membrane pâteuse							
15 274		10 ⁻¹						15 267 AB 21	N	
15 275		10 ⁻¹			15 275 AB 21	N				
15 276		10 ⁻¹	membrane laide		15 270 AB 21	N				
15 277		10 ⁻¹	éliminé		15 275 AB 21	N				
15 278		10 ⁻²								
15 279		10 ⁻²	membrane laide, liquide séro-sanguinolant							
15 280		10 ⁻²	tué, grosse membrane pâteuse		15 273 AB 21					
15 281		10 ⁻²	petite membrane		15 281 AB 21			P		
15 282	15 183 AB 22	10 ⁻¹	belle membrane	1 colonie	15 282 AB 22	P	10 ⁷ Chl/mL			
15 283		10 ⁻¹	belle membrane		15 283 AB 22	P	< 10 ⁶ Chl/mL			
15 284		10 ⁻¹			15 283 AB 22	P				
15 285		10 ⁻²			15 283 AB 22	P				
15 286		10 ⁻²	membrane laide		15 286 AB 22	P	< 10 ⁶ Chl/mL			
15 287		10 ⁻²	petite membrane		15 286 AB 22	P	< 10 ⁶ Chl/mL			
15 288		10 ⁻²	petite membrane		15 288 AB 22		< 10 ⁶ Chl/mL			
15 289		10 ⁻²	petite membrane		15 286 AB 22	P				
15 290		10 ⁻²	belle membrane		15 282 AB 22	P	10 ⁷ Chl/mL			
15 291		10 ⁻²	belle membrane		15 282 AB 22	P	10 ⁷ Chl/mL			
15 292		10 ⁻²	belle membrane		15 282 AB 22	P	10 ⁷ Chl/mL			
15 293		10 ⁻³	éliminé		15 294 AB 22	P	< 10 ⁶ Chl/mL			
15 294		10 ⁻³	petite membrane							
15 295		10 ⁻³	éliminé							
15 296		10 ⁻³	belle membrane mais œuf cassé							
15 297		10 ⁻³	très belle membrane							
15 298		10 ⁻³	très belle membrane							
15 299		10 ⁻³	très belle membrane							
15 300		10 ⁻³	belle membrane							
15 301		10 ⁻⁴	belle membrane					?	P	< 10 ⁶ Chl/mL
15 302		10 ⁻⁴	très belle membrane							
15 303		10 ⁻⁴	belle membrane							
15 304		10 ⁻⁴	belle membrane mais œuf cassé							
15 305		10 ⁻⁴	très belle membrane							
15 306		10 ⁻⁴	très belle membrane							
15 307		10 ⁻⁴	éliminé							
15 308		10 ⁻⁴	belle membrane		15 283 AB 22	P				
15 309		15 261 AB 23	pure		tué	3 colonies	15 309 AB 23	P	10 ³ Chl/mL	
15 310	pure		tué, grosse membrane pâteuse	15 309 AB 23	P					
15 311	pure		tué, grosse membrane pâteuse	15 309 AB 23	P					
15 312	pure		belle membrane, contaminé	15 313 AB 23	P					
15 313	pure		belle membrane							
15 314	10 ⁻¹		tué, membrane se délite							
15 315	10 ⁻¹			15 315 AB 23	P					
15 316	10 ⁻¹		embryon autolysé, membrane laide	15 315 AB 23	P					
15 317	10 ⁻¹		tué, grosse membrane pâteuse	15 309 AB 23	P					
15 318	10 ⁻¹		tué, éliminé							

N° œuf	Inoculum	Dilution	Observations	Bct	Souche	Résultat PCR	Concentration	
15 319	15 172 AB 21	pure	belle membrane, contaminé	+	15 319 AB 21	P		
15 320		pure	très belle membrane, contaminé	++	15 320 AB 21			
15 321		pure			15 321 AB 21			
15 322		pure	belle membrane, contaminé	+	15 319 AB 21			
15 323		pure			15 321 AB 21			
15 324		pure	petite membrane		15 324 AB 21			
15 325		10 ⁻¹	tué, grosse membrane pâteuse		15 325 AB 21			
15 326		10 ⁻¹	tué, membrane laide		15 325 AB 21			
15 327		10 ⁻¹	éliminé					
15 328		10 ⁻¹	petite membrane		15 324 AB 21			
15 329		10 ⁻¹	contaminé	+	15 319 AB 21			
15 330		10 ⁻¹	tué, membrane se délite		15 325 AB 21			
15 331		10 ⁻¹	éliminé					
15 332	10 ⁻¹	contaminé	+	15 332 AB 21				
15 333	15 251 AB 21	pure	tué, membrane pâteuse		15 333 AB 21	P	10 ⁴ Chl/mL	
15 334		pure	tué		15 333 AB 21	P	10 ⁴ Chl/mL	
15 335		pure			15 271 AB 21			
15 336		10 ⁻¹	tué, grosse membrane pâteuse		15 333 AB 21	P	10 ⁴ Chl/mL	
15 337		10 ⁻¹	éliminé					
15 338		10 ⁻¹	éliminé					
15 339		10 ⁻¹	éliminé					
15 340		10 ⁻¹	belle membrane		15 340 AB 21	N		
15 341	15 259 AB 23	pure	éliminé			N		
15 342		pure	éliminé					
15 343		pure	éliminé					
15 344		pure	éliminé					
15 345		pure	éliminé					
15 346		10 ⁻¹	éliminé					
15 347		10 ⁻¹	éliminé					
15 348		10 ⁻¹	membrane laide		15 348 AB 23			
15 349		10 ⁻¹	tué, grosse membrane pâteuse		15 349 AB 23			
15 350		10 ⁻¹	éliminé					
15 351	15 263 et 15 264 AB 22	pure	belle membrane	1 colonie	15 351 AB 22	P		
15 352		pure	petite membrane		15 352 AB 22			
15 353		10 ⁻¹	éliminé					
15 354		10 ⁻¹	tué, belle membrane		15 354 AB 22			N
15 355		10 ⁻¹	tué, membrane se délite		15 354 AB 22			N
15 356		10 ⁻¹	tué, membrane se délite		15 354 AB 22			N
15 357	15 232 AB 22	pure	belle membrane		15 305 AB 22	P	10 ⁸ Chl/mL	
15 358		pure	petite membrane		15 351 AB 22			
15 359		10 ⁻¹	belle membrane		15 359 AB 22			
15 360		10 ⁻¹	belle membrane		15 359 AB 22			
15 361		10 ⁻¹	petite membrane		15 359 AB 22			

Annexe 10: Résultats de la troisième mise en culture sur œufs embryonnés des souches AB 21 et AB 23.

N° œuf	Inoculum	Dilution	Observations	Bct	Souche	Résultat PCR	
15 362	15 309 AB 23	1/2	éliminé tué, membrane épaisse jolie membrane mais déliquescente membrane déliquescente membrane déliquescente belle membrane tué, membrane épaisse tué, membrane épaisse petite membrane mais jolie tué, membrane épaisse grosse membrane déliquescente, liquide séro-sanguinolant belle membrane	++	15 366 AB 23 15 367 AB 23 15 368 AB 23 15 367 AB 23 15 367 AB 23 15 366 AB 23 15 382 AB 23 15 374 AB23 15 366 AB 23 15 368 AB 23 15 377 AB 23	N N N N N N N N N N N	
15 363		1/2		+++			
15 364		10 ⁻¹		++			
15 365		10 ⁻¹					
15 366		10 ⁻¹					
15 367		10 ⁻¹					
15 368		10 ⁻¹					
15 369		10 ⁻¹					
15 370		10 ⁻¹					
15 371		10 ⁻¹		+			
15 372		10 ⁻²					
15 373		10 ⁻²					
15 374		10 ⁻²					
15 375		10 ⁻²					
15 376		10 ⁻²					
15 377	10 ⁻²						
15 378	15 313 AB 23	1/2	tué, membrane résorbée éliminé membrane épaisse tué, membrane épaisse tué, membrane épaisse tué, membrane épaisse membrane épaisse et déliquescente tué, membrane résorbée gros fœtus, membrane assez jolie éliminé tué, belle membrane, petit embryon tué		15 378 AB 23 15 380 AB 23 15 381 AB 23 15 382 AB 23 15 366 AB 23 15 382 AB 23 15 381 AB 23 15 386 AB 23 15 374 AB23 15 388 AB 23 15 386 AB 23 15 374 AB23 15 388 AB 23 15 386 AB 23 15 391 AB 23 15 388 AB 23 15 393 AB 23	N N N N N N N N N N N N N N N	
15 379		1/2					
15 380		10 ⁻¹					
15 381		10 ⁻¹					
15 382		10 ⁻¹					
15 383		10 ⁻¹					
15 384		10 ⁻¹					
15 385		10 ⁻¹					
15 386		10 ⁻¹					
15 387		10 ⁻¹					
15 388		10 ⁻²					
15 389		10 ⁻²					
15 390		10 ⁻²					
15 391		10 ⁻²					
15 392		10 ⁻²					
15 393	10 ⁻²						
15 394	15 321 AB 21	1/2	jolie membrane petite membrane jolie membrane petite membrane jolie membrane membrane laide éliminé petite membrane petite membrane membrane laide	+ + ++ ++ + + + ++ ++ + + ++ ++ ++ ++	15 402 AB 21	N	
15 395		1/2					
15 396		10 ⁻¹					
15 397		10 ⁻¹					
15 398		10 ⁻¹					
15 399		10 ⁻¹					
15 400		10 ⁻¹					
15 401		10 ⁻¹					
15 402		10 ⁻¹					
15 403		10 ⁻¹					
15 404		10 ⁻²					
15 405		10 ⁻²					
15 406		10 ⁻²					
15 407		10 ⁻²					
15 408		10 ⁻²					
15 409	10 ⁻²						

N° œuf	Inoculum	Dilution	Observations	Bct	Souche	Résultat PCR
15 410		1/2	éliminé			
15 411		1/2	tué, membrane épaisse		15 411 AB 21	N
15 412		10 ⁻¹	très petite membrane		15 412 AB 21	N
15 413		10 ⁻¹	tué, membrane épaisse		15 411 AB 21	N
15 414		10 ⁻¹	embryon autolysé, petite membrane		15 414 AB 21	N
15 415		10 ⁻¹	tué, membrane épaisse		15 411 AB 21	N
15 416		10 ⁻¹	assez jolie membrane		15 416 AB 21	N
15 417	15 333	10 ⁻¹			15 412 AB 21	N
15 418	AB 21	10 ⁻¹	embryon autolysé		15 414 AB 21	N
15 419		10 ⁻¹	tué, membrane épaisse		15 411 AB 21	N
15 420		10 ⁻²	tué, membrane épaisse		15 420 AB 21	N
15 421		10 ⁻²			15 416 AB 21	N
15 422		10 ⁻²	membrane déliquescence		15 412 AB 21	N
15 423		10 ⁻²	tué, membrane épaisse		15 420 AB 21	N
15 424		10 ⁻²	tué, membrane épaisse		15 420 AB 21	N
15 425		10 ⁻²	tué, membrane épaisse		15 420 AB 21	N
15 426	15 309	10 ⁻²	belle membrane		15 426 AB 23	N
15 427	15 321	10 ⁻²		+		
15 428	15 313	10 ⁻²			15 393 AB 23	N
15 429		10 ⁻²	belle membrane		15 412 AB 21	N
15 430	15 333	10 ⁻²	tué, membrane épaisse			

LToulouse, 2009

NOM : UHART

Prénom : Maia

TITRE : Chlamydophilose abortive ovine : études à propos d'une suspicion de résistance de *Chlamydophila abortus* au vaccin vivant thermosensible dans des élevages ovins laitiers du rayon de Roquefort.

RESUME :

Des cas d'avortements imputés à *Chlamydophila abortus* ont été décrits dans des élevages de brebis du rayon Roquefort (France, 12) alors que ces élevages pratiquaient la vaccination contre la chlamydophilose avec un vaccin vivant depuis plusieurs années. De brefs rappels bibliographiques concernant la chlamydophilose et la vaccination contre cette maladie sont présentés en première partie. Une enquête menée auprès de neuf éleveurs est ensuite exposée afin d'expliquer la persistance d'avortements dans ces élevages et les moyens pour y remédier. L'efficacité du vaccin Cevac ChlamydiaND vis-à-vis d'une souche locale a pu être démontrée à l'aide d'un modèle expérimental murin.

MOTS CLES : Chlamydophilose abortive ovine, *Chlamydophila abortus*, vaccin vivant, enquête, modèle murin.

ENGLISH TITLE: Ovine enzootic abortion: studies about a resistance suspicion of *Chlamydophila abortus* to the live temperature-sensitive vaccine in dairy ovine farms of the Roquefort countryside.

ABSTRACT:

Cases of abortion due to *Chlamydophila abortus* have been described in ovine farms of the Roquefort area (France, 12) whereas these farms practiced vaccination against chlamydophilosis with a live vaccine for many years. A review concerning chlamydiosis and the vaccination against this disease are presented in a first part. A survey conducted within nine breeders is secondly exposed to explain the persistence of abortion in these farms and the means to remedy to. Cevac Chlamydia® vaccine efficacy against a local strain has been shown using a mouse model.

KEYWORDS: Enzootic abortion of ewes, *Chlamydophila abortus*, live vaccine, investigation, mouse model.