

250000934

OK

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICOLES (I.S.R.A.)

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

DAKAR-HANN

TECHNIQUE D'INOCULATION DES
OEufs EMBRYONNES

STAGE FAÇ SUR LA PRODUCTION DE VACCINS
DAKAR, DU 17 OCTOBRE AU 5 NOVEMBRE 1983

Par J. SARR

REF. N° 65/VIRO.
SEPTEMBRE 1983

L'oeuf de poule fertile, incubé, présente beaucoup d'avantages par rapport à l'animal servant à la culture d'un virus :

- facilité d'approvisionnement et de coût ;
- les maladies spontanées qui nuisent à la multiplication virale sont exclues.

Le matériel de l'oeuf et l'embryon lui-même sont bactériologiquement stériles, les liquides sont clairs à l'exception du sac vitellin et l'oeuf renferme peu d'impuretés gênantes.

- Les oeufs fertiles permettent des fortes récoltes avec un virus adapté ;
- le virus adapté en ovoculture garde généralement des qualités constantes après une série de passages. Il est ainsi possible de conserver des souches virales par passages pendant des dizaines d'années sans que ces souches perdent leur structure antigénique.

L'oeuf embryonné reste donc, malgré le développement de la culture de tissus in vitro, un excellent outil de production de virus.

Exemple : Parfois, l'embryon de poulet se révèle dans les essais d'infection, réceptif à l'ARN isolé alors que le virus entier est incapable de se multiplier dans l'oeuf. (virus polio).

Nous aborderons successivement :

- l'incubation des oeufs,
- la structure de l'oeuf embryonné,
- les modalités d'utilisation de l'oeuf embryonné, pour la culture de virus,
- les différentes voies d'inoculation.
- les méthodes de prélèvement des différentes parties de l'oeuf embryonné,
- et enfin, nous évoquerons les différents facteurs qui peuvent influencer la croissance des virus dans l'oeuf embryonné.

.../...

A - INCUBATION DES OEUFS

Les oeufs fertiles destinés à la culture de virus sauvage ou vaccinal doivent provenir d'élevages indemnes d'affections virales et microbiennes comme le virus de la maladie de Newcastle et les mycoplasmes. Il est nécessaire d'incuber les oeufs pendant au moins 5 jours avant de pouvoir sélectionner les oeufs embryonnés.

Pour cela, l'incubation se fait à une température de 37°C en atmosphère humide 40 à 70 %. Une trop forte humidité entraîne en général un développement trop important de la cavité aérienne : tandis que une humidité trop faible entraîne l'absence ou un développement trop faible.

Pour éviter que l'embryon n'adhère aux membranes (centralisation), les oeufs doivent être retournés plusieurs fois dans la journée à intervalles réguliers. L'âge auquel les oeufs embryonnés peuvent être inoculés est déterminé essentiellement par la voie d'inoculation.

B - STRUCTURE DE L'OEUF EMBRYONNE

Nous avons dans l'ordre :

- la coquille,
- la membrane externe qui tapisse tout l'intérieur de la coquille au sommet de l'oeuf-, le sac d'air,
- la membrane chorio-allantoïdienne, très vascularisée qui sert d'appareil respiratoire à l'embryon,

la membrane chorio-allantoïdienne est séparée de l'amnios par une cavité dite allantoïdienne qui contient 5 à 10 ml de liquide;

- la membrane amniotique qui enferme l'embryon dans une cavité qui contient environ 3. ml de liquide.
- le sac vitellin est rattaché à l'embryon et contient toutes les substances nutritives,

MODALITES D'UTILISATION DE L'OEUF EMBRYONNE POUR LA CULTURE DE VIRUS

1) Choix du site d'inoculation dans l'oeuf embryonné

Souche virale	Localisation de la multiplication			
	NCA	Cavité allantoïdienne	Sac amniotique	Sac vitellin
• Variole de la poule et des oiseaux	+	+		
• Laryngotrachéite infectieuse	t		+	
• Newcastle	t	+	+	
• Variole humaine	t			
- Herpès	t			+
• Myxomatose	t			
• Stomatite vésiculeuse	t			
- Grippe A et B	t	+	+	+
• Ornithose - psittacose	t	+	+	
• Fièvre vallée du Rift	t			+
• Fièvre jaune	t			
• Rage	+	+		+
• Rickettsias				+
• Peste aviaire classique	t	+	+	+
• Encéphalomyélite équine Ouest, Est, et Venezuela	t	+	+	+
• Blue tongue				+

La plupart des arborivirus peuvent être cultivés sur oeuf, Pour cela, il est recommandé d'utiliser la voie intraveineuse et/ou intracérébrale.

2) Stades de développement embryonnaire choisis pour l'inoculation

Voie d'inoculation	Age des embryons
Membrane chorio-allantoïdienne	10 -- 3.2 jours
Cavité amniotique	7 -- 14 jours
Cavité allantoïdienne	7 -- 11 jours
Sac vitellin	5 -- 7 jours
Voie veineuse	8 -- 11 jours
Voie cérébrale	8 -- 13 jours

D - DIFFERENTES VOIES D'INOCULATION

Il faut marquer sur la lampe de mirage, avant l'inoculation, les points prévus pour les injections,

Ce marquage doit se faire à l'aide d'un crayon dont les caractères ne s'effacent pas au cours de la désinfection ultérieure de la coquille. La teinture d'iode est utilisée de préférence comme désinfectant, sauf pour l'inoculation de la MCA, où la pénétration de l'iode à travers la coquille peut provoquer des lésions non spécifiques. Une simple désinfection de la coquille est largement suffisante,

1) Inoculation de la MCA

Deux procédés simples peuvent être utilisés. Ils ont l'avantage de ne pas provoquer des lésions non spécifiques susceptibles de gêner le diagnostic.

a> Une zone située au-dessus de l'embryon est marquée à l'aide de la lampe de mirage. Cette zone est ensuite soigneusement désinfectée puis un triangle est découpé dans la coquille à l'aide d'une fraise de dentiste ou d'une lime à ampoule, sans endommager la membrane coquillière sous-jacente.

Eviter autant que possible que la MCA ne se détache et ne s'affaisse.

Les oeufs présentant des hémorragies au cours de cette opération sont à éliminer.

Le triangle est enlevé avec précaution et une goutte de l'inoculum est déposée sur la membrane coquillière à l'aide d'une aiguille. Puis la membrane coquillière

.../...

re est fendue au milieu de la goutte qui peut alors s'infiltrer par capillarité entre la coquillère et la MCA. Le reste de l'inoculum peut alors être mis goutte à goutte et ne doit jamais dépasser 0,2 ml.

Le triangle est remplacé et fixé sur la fente par de la paraffine..

Les oeufs peuvent alors être remis à l'incubateur avec le lieu d'inoculation dirigé vers le haut.

b) Après marquage (zone d'inoculation et bord de la chambre à air) et désinfection, un ovale est découpé au-dessus de l'embryon sans endommager la coquillère. On enlève le fragment ovale et l'on fait un trou au niveau de la chambre à air.

là membrane coquillère est percée avec une pince de dentiste pour que l'air extérieur puisse appuyer sur la MCA. La membrane est ainsi décollée, Avec la pince de dentiste, toute la membrane coquillère est enlevée de la zone ouverte et l'inoculum peut être déposé dans la dépression. Le trou de la chambre à air peut être rebouché avec de la paraffine et l'ovale par un film,

2) Injection dans la cavité allantoïdienne

a) Marquage sur la lampe de mirage, du bord de la chambre, dans la zone des gros vaisseaux de la MCA et du lieu d'inoculation près des vaisseaux et de la chambre. Eviter les lésions du vaisseau au cours de l'injection-

L'oeuf est placé en position horizontale sur un support approprié.

Percer la coquille au lieu d'inoculation indiqué avec une fraise de dentiste sans léser la membrane coquillère. L'inoculum est injecté avec une aiguille de 16 ou 18 mm dont la pointe est enfoncée de 2 mm, verticalement, dans la cavité allantoïdienne située sous le trou de la coquille, Le trou de la chambre à air et le lieu d'injection sont ensuite bouchés à la paraffine.

b) Une autre variante de cette technique est une inoculation sous le contrôle de l'appareil à mirer.

3) Injection dans la cavité amniotique

L'inoculation de l'oeuf s'effectue sous la lampe de mirage. L'utilisation du bleu de méthylène peut permettre un contrôle efficace de la zone inoculée.

Le trou de la coquille se fait au niveau de la chambre à environ 0,5 cm du bord de la chambre à air.

L'aiguille est enfoncée verticalement et perce la membrane coquillière, la MCA et la membrane amniotique,

La quantité d'inoculum ne doit jamais dépasser 0,2 ml.

Inoculation dans le sac vitellin

- Percer un trou dans la coquille au pôle de l'oeuf.
- Incliner l'oeuf de 20 à 25° par rapport à la verticale, à 0,5 cm de cet orifice. On perce un autre.
- Injecter l'inoculum en introduisant entièrement une aiguille de 7/30.

Inoculation intraveineuse

Repérer une veine suffisamment grosse et droite à partir du tronc commun situé au voisinage de la chambre à air. Dessiner son tracé au crayon.

Découper d'un volet de coquille au-dessus de la veine sans endommager la membrane coquillière.

Déposer une goutte de vaseline stérile pour rendre transparente la membrane coquillière.

Repérer le sens du courant sanguin.

Introduire l'aiguille de 4/15 à biseau court montée sur une seringue dans le sens du courant sanguin : inoculer après légère ponction 0,05 à 0,5 ml.

Inoculation intracérébrale

Opérer comme pour la cavité amniotique. Saisir la tête avec une pince fine et la tenir par la paupière ou le bac.

Enfoncer l'aiguille (4/10) de 2 mm et injecter l'inoculum (0,02 ml environ)

F. - PRELEVEMENTS DES DIFFERENTES PARTIES DE L'OEUF EMBRYONNE

1) Matériel

- Pipettes Pasteur et pipettes à boule d'une contenance de 5 à 15 ml avec un orifice latéral,
- des tubes de 18 stériles ou des flacons,
- des tubes de milieu de culture pour contrôle de la stérilité (milieux pour aérobies et anaérobies) ,
- des pinces fines sans mors,
- des petits ciseaux droits et courbes,
- des pinces fines à mors.

2) Prélèvement des liquides

Pour éviter l'ouverture des vaisseaux au cours des différents prélèvements, on placera les oeufs au moins une nuit de 0 à + 4°C ou quelques heures dans une chambre à glace avant l'ouverture. Eviter autant que possible la congélation.

a) Liquide amniotique

Le liquide amniotique est clair (eau de roche), 2 à 3 ml dans un oeuf normal incubé 12 jours. Après inoculation, ce volume est généralement inférieur et peut se réduire à quelques gouttes. Le liquide peut également devenir trouble.

Pour le recueillir, après ouverture de l'oeuf, vider le liquide allantoïque, saisir avec une pince fine à mors la poche amniotique, introduire l'extrémité d'une pipette à boule et aspirer.

b) Liquide allantoïque

L'oeuf est placé verticalement, on enlève délicatement la membrane coquillère et la MCA sans léser les vaisseaux.

Prélever par aspiration.

3) Prélèvement des tissus

a) La MCA

- Ouvrir l'oeuf au niveau de la chambre à air ;
- dégager soigneusement la membrane coquillère ;

.../...

- faire une brèche sur la MCA ;
- vider le contenu de l'oeuf.

La MCA reste collée sur la paroi de l'oeuf.

b) L'embryon

Ouvrir l'oeuf comme précédemment et à l'aide d'une pince à griffe, extirper l'embryon et couper le pédicule ombilical.

c) Le sac vitellin

- ouvrir l'oeuf comme pour le liquide allantoïque ,
- faire une brèche dans la MCA et extirper l'embryon avec une pince et couper le pédicule ombilical.,
- prendre le pédicule: sortir le sac et le placer dans une boîte de pétri.

4) Contrôle de stérilité

Il est réalisé sur chaque type de récolte par l'ensemencement de milieux appropriés.

F * FACTEURS POUVANT INFLUENCER LA CROISSANCE DES VIRUS DANS L'OEUF EMBRYONNE

Parmi les facteurs pouvant influencer la croissance des virus dans l'oeuf embryonné, nous pouvons citer :

a) la voie d'inoculation

Si pour un virus déjà identifié, on peut choisir la partie de l'oeuf permettant un développement optimum, il n'en est pas de même pour les produits contenant un virus dont on ne connaît pas la nature, ni par conséquent les propriétés.

b) Les contaminations bactériennes et mycoplasmiques

Elles peuvent être limitées par la centrifugation des suspensions et l'utilisation d'antibiotiques. Ne pas oublier que certains antibiotiques peuvent gêner à forte concentration le processus de multiplication virale, alors que d'autres sont sans effet, Exemple, le Virus de la grippe se développe dans l'oeuf en présence de 12.000 UI de Penicilline alors qu'on ne dispose guère 500 à 1.000 UI.

c) La toxicité pour l'embryon des inoculums

- broyats d'organe
- antibiotiques.

d) La solution pour la dilution des virus à inoculer

La solution peut contenir des **inhibiteurs** naturels du **virus** (solution **serum** humain, **serum** de lapin, **serum** de cheval, etc.,),

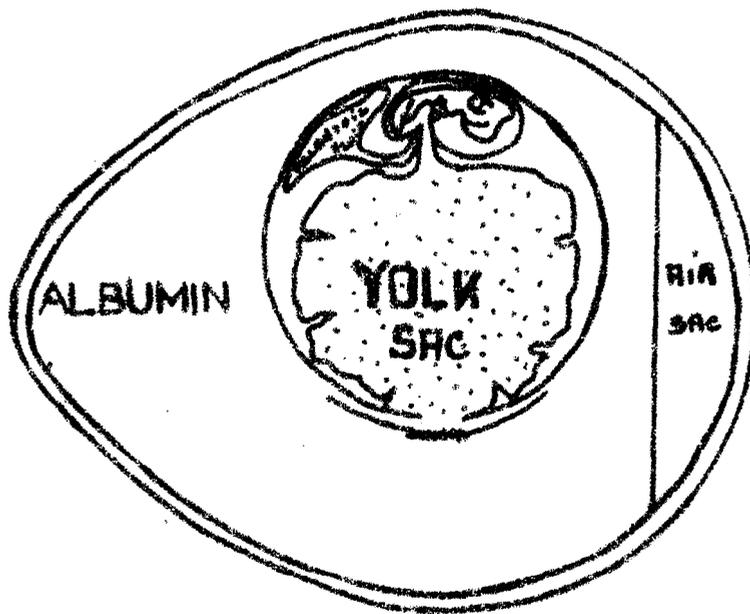
La **stabilité** du virus dans ces solutions constitue **généralement** une étape délicate,

Compte tenu de tous ces **facteurs** pouvant influencer la **croissance du virus** dans l'oeuf **embryonné**, chaque **méthode retenue** représente en fait un compromis entre les avantages et les inconvénients **possibles**.

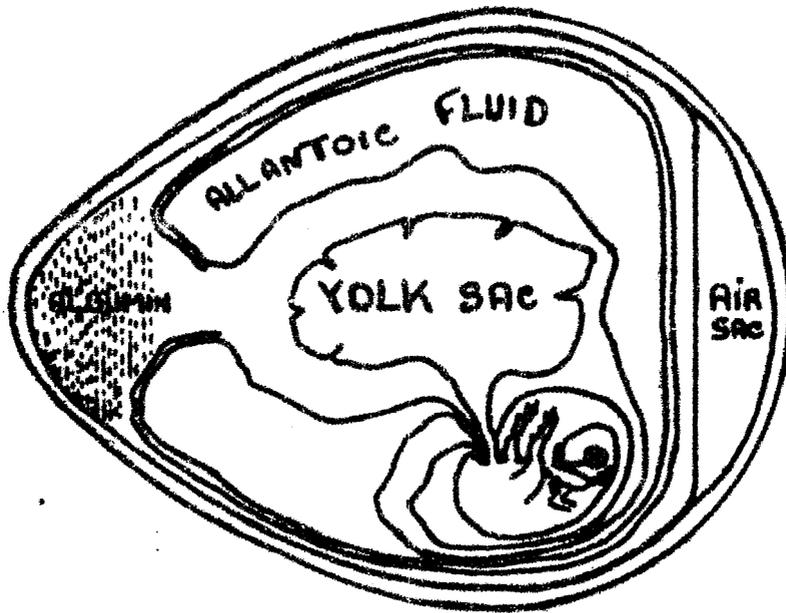
POUR EN SAVOIR PLUS :

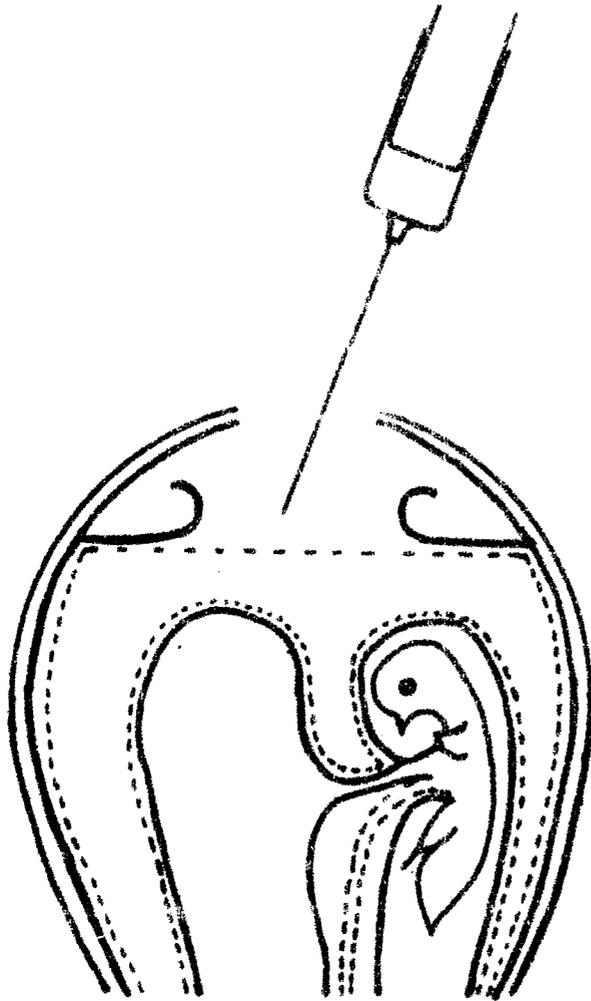
1. DENIS Jr, et PRINZIE, A., 1962
Influenza of chick embryoage on assay of poliovirus RNA in embryonated eggs. *Virology* : 17 216 - 217.
2. HENNEBERG G. et KOHLER - 1961
Praktikum der virusdiagnostik. Ed G. Fischer Stuttgart.
3. ANDREWS and PFREIRA - 1972
Viruses of vertebrates. Third Ed. Baillière Tindall London.
4. EDWIN H., LENNETTE and NATHALIE J. SCHMIDT - 1969
Diagnostic procedures of viral and Rickettsial infectious. Am. Pub. Health Associat. Inc Fourth Ed.
5. ROLIERER FI, - 1969
Traité des maladies à virus des animaux - Vigot Frères Ed.
6. COX H.R. - 1952
Facteurs pouvant influencer la croissance des virus dans l'oeuf embryonné. *Ann. N.Y. Acad. sci.*, 55, 236.

OEUF EMBRYONNE DE 6 JOURS -

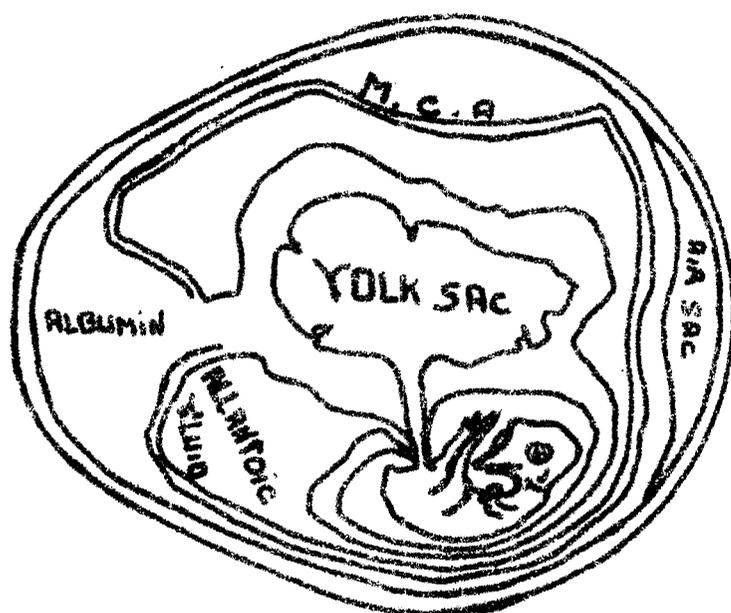


OEUF EMBRYONNE DE 10 JOURS

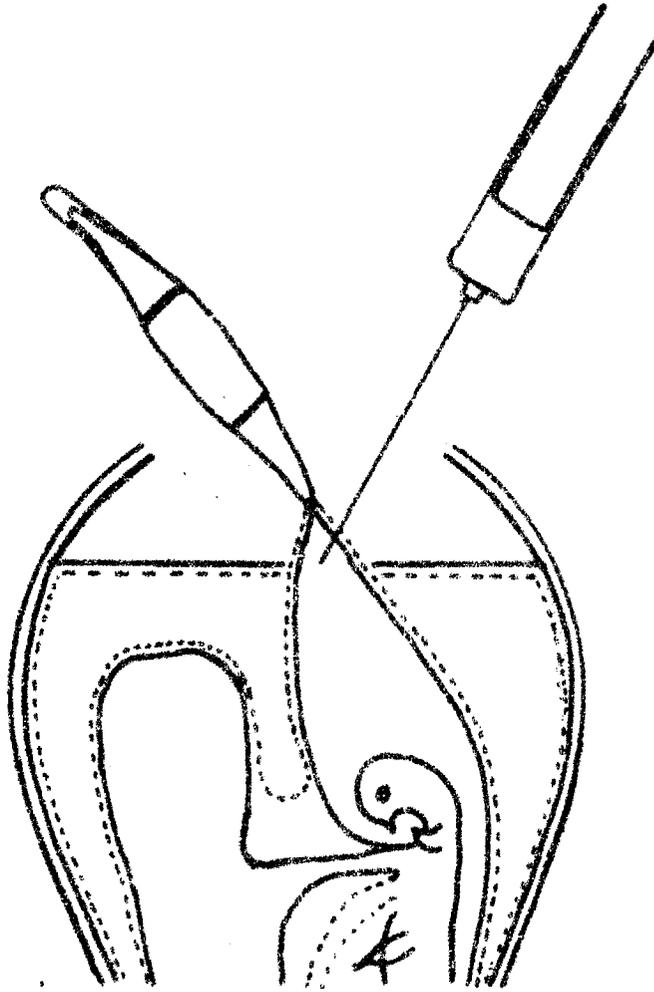




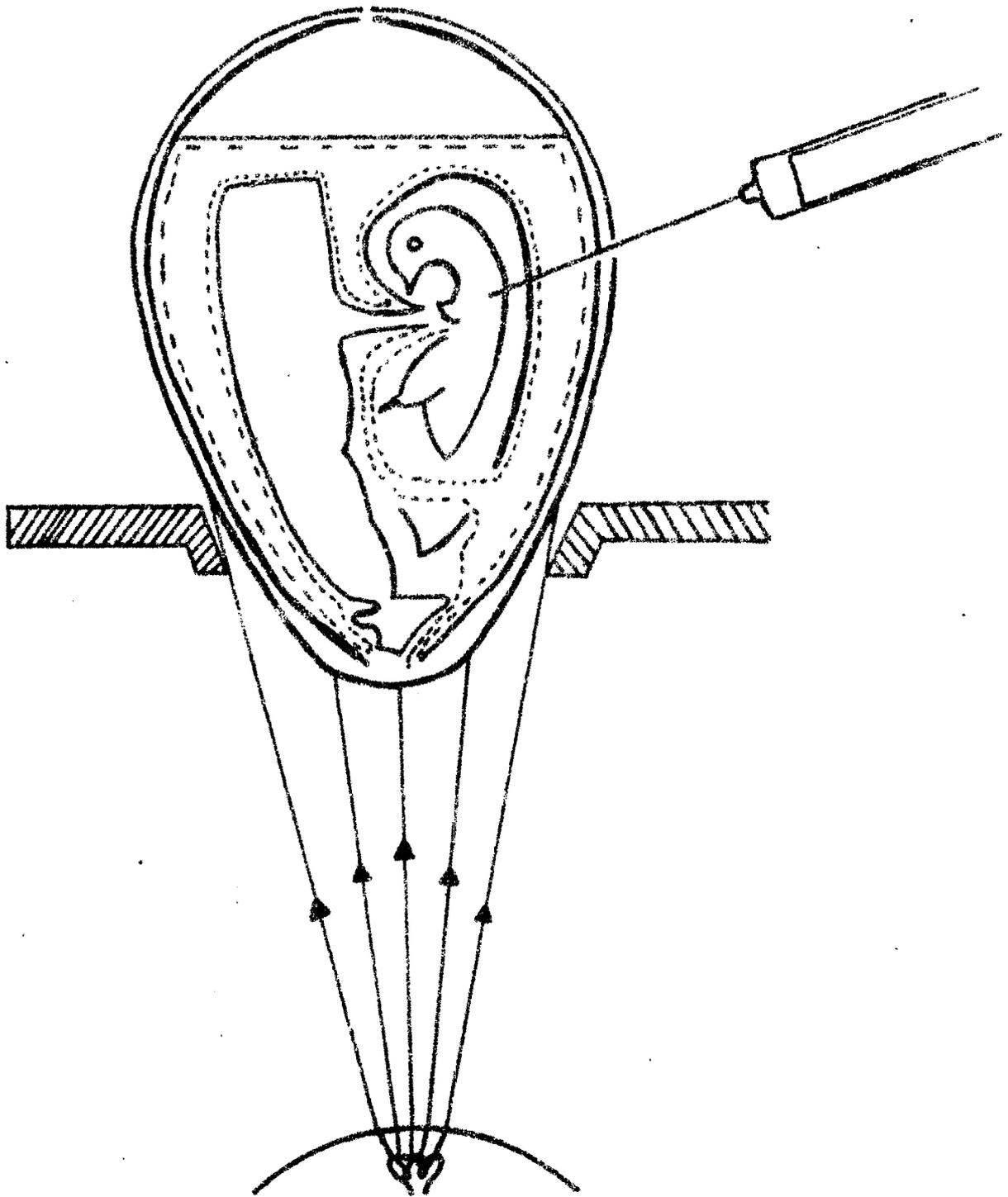
INOCULATION DANS LA MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE



INOCULATION SUR LA MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE
D'UN EMBRYON DE 10 JOURS



INOCULATION DANS LA CAVITE AMNIOTIQUE DE L'OEUF
EMBRYONNE .



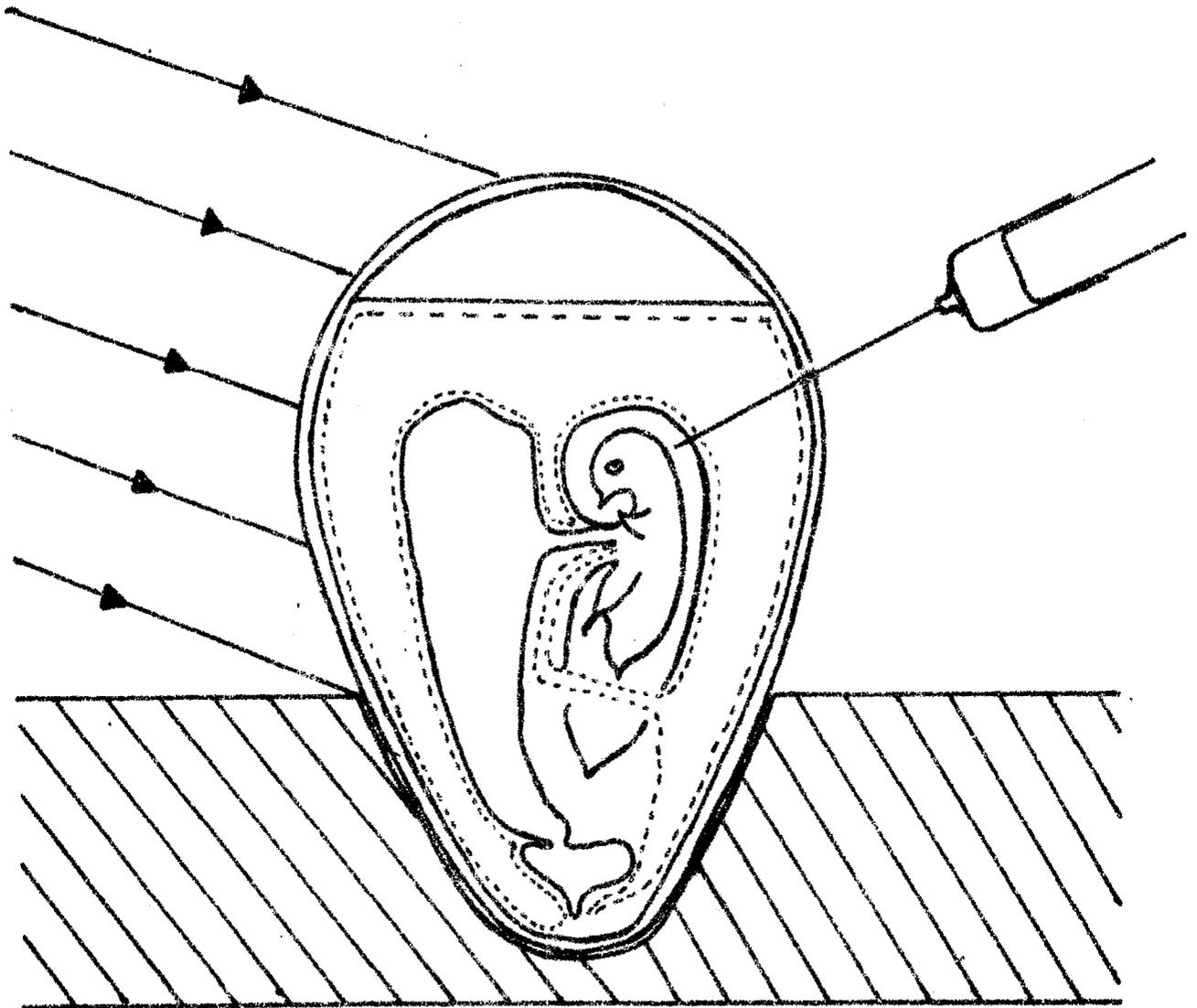
INOCULATION DANS LA CAVITE AMNIOTIQUE .

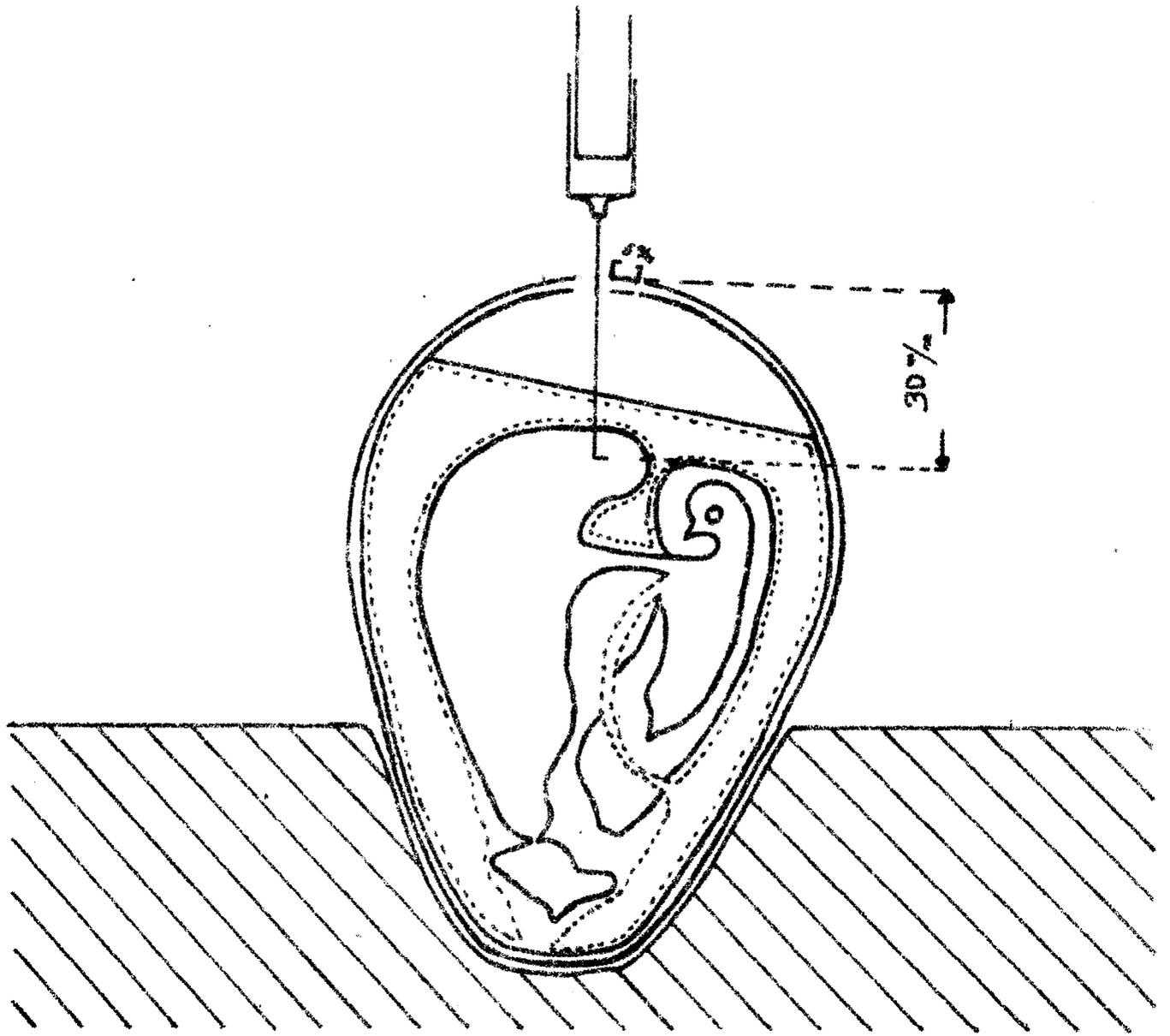
[HIRST] -

REPRO. INERV. Doc / HDM

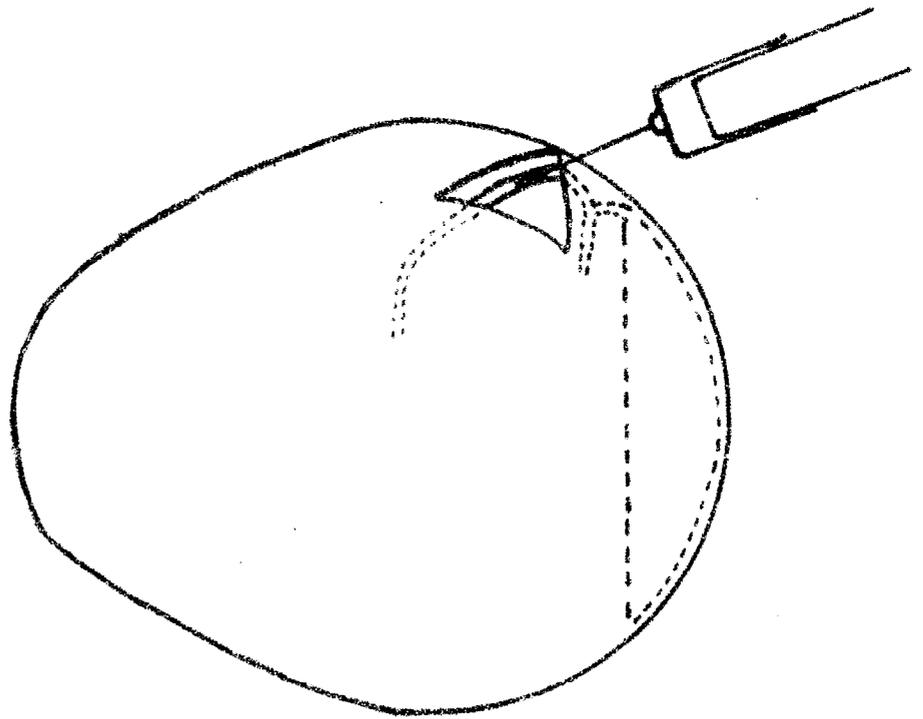
INOCULATION DANS LA CAVITE AMNIOTIQUE

[SOHIER & BSSER]





INOCULATION DANS LE SAC VITELLIN .



INOCULATION INTRA-VENEUSE .

Reprod. LNREV. 506 / HDM