

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	5
I. Caractéristiques du virus, manifestations cliniques et épidémiologie.....	7
A. Caractéristiques du virus	7
B. Pathogénie.....	8
1. Dissémination virale	8
2. Excrétion virale et latence	9
3. Réactivation et réexcrétion virales.....	10
C. Epidémiologie	11
1. Epidémiologie descriptive	11
a. Espèces contaminées par le BHV-1	11
b. Séroprévalence en France.....	11
c. Séroprévalence en Europe	11
d. Différences de séroprévalence selon les caractéristiques des troupeaux	12
e. Séroprévalence des animaux par cheptel.....	12
2. Epidémiologie analytique	12
a. Sources virulentes.....	12
b. Modalités de la contagion	13
c. Réceptivité.....	13
3. Epidémiologie synthétique	13
a. Contamination	13
b. Maintien de l'infection	14
II. BHV-1 et troubles de la reproduction.....	15
A. Infertilité mâle	15
B. Infertilité femelle	15
1. Vulvovaginite pustuleuse (IPV: Infectious Pustular Vulvovaginitis)	15
2. Anomalies du fonctionnement ovarien.....	16
3. Métrites	17
4. Mortalité embryonnaire	17
5. Avortement	18
6. Forme généralisée chez les veaux nouveau-nés	19
III. BHV-1, saillie naturelle et insémination artificielle.....	21
A. Excrétion du virus dans le sperme	21
1. Durée d'excrétion	21
2. Quantité excrétée	21
B. Contamination par voie vénérienne	22
1. Dose infectante	22
2. Conséquences cliniques	22
IV- BHV-1 et transfert embryonnaire	23
A. Matières infectieuses	23
1. Sperme	23
2. Gonades et tractus génital femelles	23
3. Embryons.....	23
a. Embryons obtenus <i>in vivo</i>	24
b. Embryons obtenus <i>in vitro</i>	25

α. Contamination <i>in vivo</i>	26
β. Contamination <i>in vitro</i>	26
4. Milieux de maturation et de culture.....	26
B. Conséquences d'une contamination par le BHV-1 pour la production d'embryons	27
1. Rendements.....	27
a. <i>In vivo</i>	27
b. <i>In vitro</i>	27
α. Maturation	27
β. Fécondation	28
γ. Développement.....	28
2. Taux de gestation.....	29
3. Conséquences pour la receveuse et le nouveau-né.....	29
V- Méthodes de diagnostic	31
A. Diagnostic de laboratoire.....	31
1. Diagnostic direct.....	31
2. Diagnostic indirect.....	31
B. Détection du BHV-1 en cas d'avortement.....	32
C. Détection du virus dans les paillettes de sperme	33
1. Méthodes <i>in vitro</i>	33
2. Méthodes <i>in vivo</i>	33
VI. Prophylaxie	35
A. Prophylaxie sanitaire	35
1. Contrôle à l'introduction.....	35
2. Contrôle des taureaux de centre d'insémination artificielle	35
3. Contrôle des donneuses d'ovocytes et des receveuses d'embryons.....	36
4. Contrôle des semences.....	36
5. Précautions vis-à-vis de la contamination des milieux de maturation, fécondation et culture	37
6. Contrôle de qualité sanitaire de la manipulation	37
7. Elimination des animaux séropositifs.....	39
B. Prophylaxie médicale.....	39
1. Vaccination	39
a. Vaccins disponibles	39
b. Efficacité de la vaccination	41
2. Traitement des semences contaminées	43
3. Traitement des embryons.....	44
CONCLUSION.....	46

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le virus BHV-1 d'après [120].	7
Figure 2 : Description d'une primo-infection par le BHV-1 jusqu'à l'établissement de l'état latent (d'après [120]).	9
Figure 3 : Les conséquences de la réactivation du BHV-1 : la réexcrétion est contrôlée par la réponse immunitaire spécifique (d'après [120]).	10

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Différences environnementales, morphologiques et physiologiques entre les embryons produits <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> (d'après [4]).	25
Tableau II : Les types de vaccins disponibles en France contre l'IBR (d'après [118]).	39
Tableau III : Résultat des tests ELISA classiques et associés à un vaccin délété en fonction du statut immunitaire de l'animal.	40
Tableau IV : Protocole de vaccination à appliquer dans le cadre d'un plan de lutte contre l'IBR.	43

LISTE DES ABREVIATIONS

ACERSA = Association pour la CERTification de la Santé Animale en élevage

BHV-1 = bovine herpesvirus de type 1

BVD = diarrhée virale bovine

DICC₅₀ = dose infectante en culture cellulaire

DICT₅₀ = dose infectante en culture tissulaire

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

FNGDSB = Fédération Nationale des Groupements de Défense Sanitaire du Bétail

IBR = rhinotrachéite infectieuse bovine

IETS = International Embryo Transfer Society

IPV = vulvovaginite infectieuse pustuleuse

PCR = polymerase chain reaction

SOF = Synthetic Oviduct Fluid

INTRODUCTION

Le BHV-1 ou herpesvirus bovin de type 1 était surtout connu jusque dans les années 70 comme responsable d'une maladie vénérienne relativement bénigne : l'IPV (Infectious Pustular Vulvovaginitis). Les changements de conditions d'élevage associés à de probables mutations virales ont vu émerger à partir de cette période, la forme respiratoire ou IBR (Infectious Bovine Rhinotracheitis), désormais largement prédominante. Cependant, l'infection par le BHV-1 a des conséquences majeures dans le domaine de la reproduction bovine.

Si le BHV-1 peut être à l'origine de troubles de la reproduction qui ne sont pas sans conséquences économiques pour les élevages atteints, notamment des avortements, les principaux problèmes posés aujourd'hui dans le domaine de la reproduction sont de l'ordre de la contamination inter-élevages. L'excrétion virale dans la semence associée en particulier à l'insémination artificielle semble permettre une dissémination virale importante d'un cheptel à l'autre si aucun contrôle n'est mis en place. De plus, les nouvelles techniques de reproduction assistée telles que le transfert embryonnaire posent de nouvelles interrogations sur le pouvoir contaminant des matériaux biologiques manipulés. Les moyens de lutte jusque là utilisés pour lutter contre la forme clinique respiratoire doivent donc s'adapter à ces nouvelles données, de façon à se rapprocher le plus possible d'une protection virologique afin d'empêcher toute dissémination virale intra ou inter-élevage.

Après avoir rappelé les caractéristiques du BHV-1 et son épidémiologie, nous présenterons les conséquences cliniques de l'infection par ce virus dans le domaine de la reproduction puis les problèmes posés par ce virus dans le cadre de la saillie naturelle et de l'insémination artificielle, mais aussi du transfert embryonnaire. Enfin, nous examinerons les méthodes de diagnostic et les stratégies de lutte contre le BHV-1 en insistant particulièrement sur celles ayant rapport avec la reproduction bovine.

I. Caractéristiques du virus, manifestations cliniques et épidémiologie

A. Caractéristiques du virus

Le complexe IBR (Infectious Bovine Rhinotracheitis) / IPV (Infectious Pustular Vulvovaginitis) est une maladie virale du bétail provoquée par l'herpesvirus bovin de type 1 (BHV-1) qui appartient au genre des Varicellovirus et à la sous-famille des alphaherpesvirinae. Cette sous-famille a pour particularités selon le Comité International de Taxonomie des Virus : un éventail d'hôtes possibles important, une croissance rapide en culture, un cycle de reproduction court, une destruction des cellules infectées et la capacité d'établir une infection latente à vie prioritairement mais pas exclusivement dans les ganglions [27]. Le virus possède un tropisme pour les cellules épithéliales, les cellules mononucléées sanguines et les neurones. Le BHV-1 est un virus enveloppé, les glycoprotéines de son enveloppe jouant un rôle essentiel dans les interactions avec les cellules hôtes (figure 1).

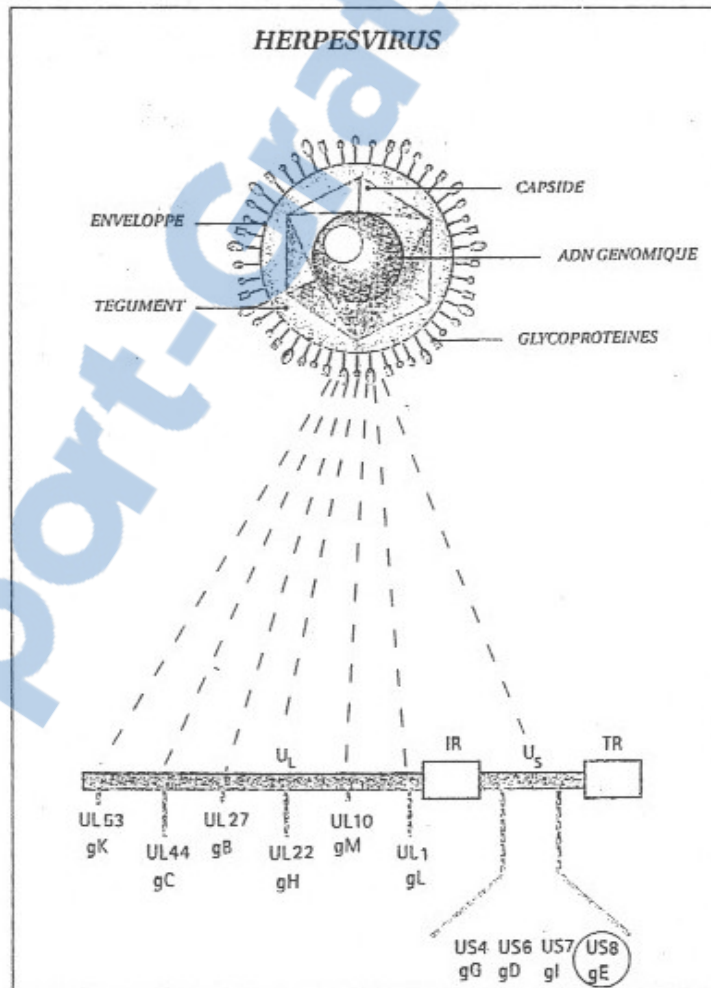


Figure 1 : Le virus BHV-1 (d'après [120]).

Le génome est constitué d'un ADN bicaténaire. Les gènes codant pour les glycoprotéines virales connues sont mentionnés (UL : région unique longue, US : région unique courte, IR : répétition interne, TR : répétition terminale)

Il n'y a qu'un seul type antigénique de BHV-1, que le virus soit isolé d'une infection respiratoire ou génitale. Trois génotypes de BHV-1 ont été décrits, sous-type 1 (BHV1-1) et sous-type 2, ce dernier étant lui-même divisé en deux sous-groupes a (BHV1-2a) et b (BHV1-2b) [66]. Ceux-ci ont été établis après comparaison des fragments d'ADN obtenus après digestion de différentes souches par des enzymes de restriction. Bien que ces sous-types soient souvent appelés « IBR-like » pour le type 1 et « IPV-like » pour le type 2, les rapports entre les génotypes et les propriétés biologiques des sous-types ne sont pas bien établis [34]. Le sous-type 2b semble toutefois être moins virulent que le sous-type 1 [35] et ne semble pas induire d'avortement après infection expérimentale à la différence des deux autres [72]. On trouve cependant des anticorps anti-BHV-1 sur des veaux nouveau-nés dont les mères ont été infectées expérimentalement durant la gestation par une souche 2b, ce qui semblerait prouver que celle-ci peut infecter le fœtus sans toutefois pouvoir le tuer.

Il a été rapporté un cas d'infection sub-clinique dans un centre d'insémination artificielle dû à un virus ne pouvant être rattaché aux sous-types 1 ou 2. L'hypothèse d'une nouvelle souche sauvage ne peut être écartée, mais celle-ci est plus probablement issue de la recombinaison entre une souche vaccinale et une souche de sous-type 2 [129].

B. Pathogénie

1. Dissémination virale

Lors d'infection, le virus se multiplie intensément au niveau de la porte d'entrée, c'est-à-dire au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire ou de la muqueuse génitale (figure 2). La dissémination de l'infection par le BHV-1 emprunte trois voies différentes : le sang, le système nerveux et la transmission de cellule à cellule [81].

L'infection primaire provoque une virémie transitoire qui peut entraîner chez l'animal adulte des localisations secondaires au niveau d'organes cibles tels que le tractus digestif, le fœtus, les ovaires ou la mamelle [143]. Le veau nouveau-né peut succomber à une généralisation de l'infection s'il n'est pas protégé par l'immunité colostrale [110].

En se multipliant au niveau de la muqueuse, le virus contamine ainsi les nerfs périphériques et remonte par voie axonale rétrograde jusqu'au ganglion nerveux régional où il s'installe à l'état latent.

Le BHV-1 peut aussi se transmettre de cellule à cellule sans phase extra-cellulaire et donc à l'abri des anticorps spécifiques, ce qui a son importance lors de réactivation d'un virus latent alors que l'animal est immunisé [117].

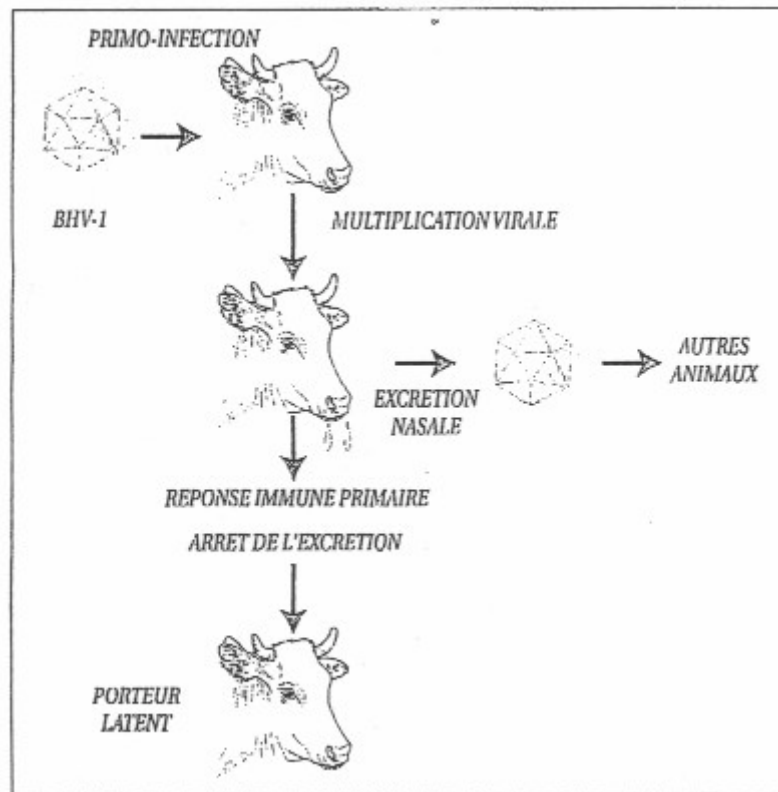


Figure 2 : Description d'une primo-infection par le BHV-1 jusqu'à l'établissement de l'état latent (d'après [120]).

2. Excrétion virale et latence

Après une multiplication intense au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse du tractus respiratoire antérieur, de la muqueuse vaginale ou préputiale, le virus est excrété dans le mucus à des taux parfois très élevés, jusqu'à 10^{10} DICT₅₀/g de mucus nasal [102]. La période d'excrétion primaire qui correspond à une forte dissémination du virus dans le milieu extérieur varie de 10 à 16 jours, avec un pic d'excrétion entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour après l'infection [102, 111]. L'excrétion vaginale et spermatique est moins forte que l'excrétion nasale, avec toutefois des taux allant jusqu'à $10^{8,5}$ DICT₅₀/ml de semence lors de la phase aiguë d'une infection naturelle ou expérimentale [41, 130].

En réponse à l'infection, l'animal développe dans un premier temps une réponse immune non spécifique suivie d'une réponse immune spécifique. Cette dernière permet au bovin de surmonter l'infection et l'arrêt de l'excrétion virale primaire. L'animal devient alors un porteur latent asymptomatique du virus : les particules virales ne sont plus décelables dans le mucus nasal mais le virus est présent de manière latente dans les neurones du ganglion régional, sous forme de génome viral non intégré, et ceci vraisemblablement à vie [119 ; figure 2]. Ainsi, l'ADN viral peut être détecté dans les cellules nerveuses du ganglion trijumeau après un épisode de maladie respiratoire [1], et dans les cellules nerveuses du ganglion sacré après inoculation intra-vaginale [2].

Cet état latent se produit après une infection primaire, une réinfection, mais aussi après une vaccination à l'aide d'un vaccin vivant atténué [117].

3. Réactivation et réexcrétion virales

L'état latent peut être rompu par un certain nombre de stimuli : transport, parturition, injection de glucocorticoïdes, surinfection par un autre virus, infestation parasitaire (bronchite vermineuse) [112, 113, 114]. Il se produit alors une réactivation virale avec de nouveaux cycles de multiplication dans l'organisme (figure 3).

La dexaméthasone semble agir directement sur le neurone contaminé de manière latente et non pas par l'immunodépression induite par l'injection de glucocorticoïdes [59]. En effet, aucune réexcrétion virale ne peut être mise en évidence après un traitement avec une dose élevée de cyclophosphamide (substance immunosuppressive agissant essentiellement sur les lymphocytes B et partiellement les lymphocytes T), chez des bovins porteurs latents [80]. D'autres expériences montrent que l'injection de glucocorticoïdes est rapidement suivie d'une induction du cycle de multiplication virale dans le neurone, ce qui plaide pour une activation directe du génome viral par le glucocorticoïde [86].

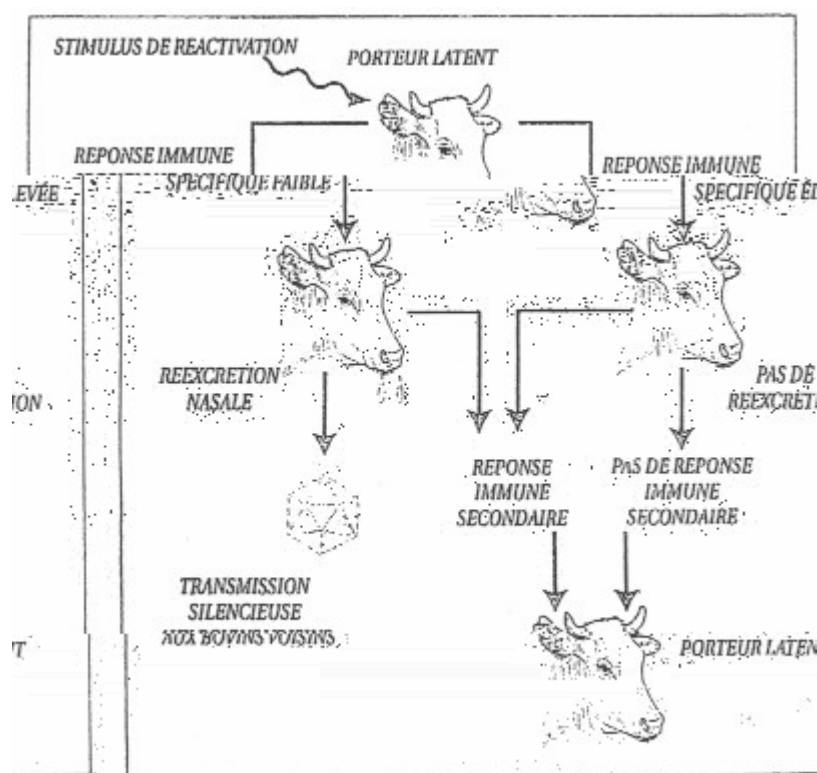


Figure 3 : Les conséquences de la réactivation du BHV-1 : la réexcrétion est contrôlée par la réponse immunitaire spécifique (d'après [120]).

Cette réactivation virale conduit le plus souvent (mais pas systématiquement) à une réexcrétion virale avec peu ou pas de signes cliniques de la maladie. Le taux de réexcrétion virale est directement influencé par l'immunité spécifique de l'animal. Cette réactivation virale provoque une hausse du taux d'anticorps spécifiques dans le sang [118].

C. Epidémiologie

1. Epidémiologie descriptive

a. Espèces contaminées par le BHV-1

Ce virus a été isolé chez le bovin et chez le mouton chez qui il peut induire une infection latente. Cependant, le rôle du mouton dans la transmission du BHV-1 au bovin est négligeable [49].

b. Séroprévalence en France

Une enquête nationale réalisée en 1995 par la FNGDSB (Fédération Nationale de Groupements de Défense Sanitaire du Bétail) a montré que 77% des départements français organisent chaque année un dépistage avec des proportions d'élevages dépistés très variables d'un département à l'autre : dépistage obligatoire sur les cheptels laitiers du Grand Ouest, volontariat le plus souvent dans les départements à vocation essentiellement allaitante.

L'estimation du taux de cheptels infectés est difficile car un certain nombre d'éléments tendent à minimiser les taux de prévalence observés (nature et proportion de la population concernée par le dépistage variables selon les départements et problèmes de représentativité correspondants, sensibilité des analyses utilisées) alors que d'autres tendent à les surestimer (interférences vaccinales). Néanmoins, en tenant compte de ces différentes données, on estime que le taux de cheptels infectés est en moyenne en France de 10 à 15% [122].

On peut observer qu'autour d'une situation épidémiologique « moyenne » les situations épidémiologiques sont très variables selon les zones. Ainsi les régions à vocation plutôt laitière ont tendance à présenter des taux de cheptels infectés faibles ou relativement limités alors que les zones à vocation allaitante présentent des taux de prévalence plus élevés [122].

c. Séroprévalence en Europe

Les informations disponibles en Europe sont parcellaires et souvent difficilement accessibles. On se heurte de plus aux mêmes problèmes techniques qu'en France, à commencer par la représentativité de la population de référence testée par rapport à la population totale. Enfin, de même qu'en France, les estimations sont perturbées par le recours massif dans certains pays à la vaccination qui jusqu'à récemment ne permettait pas de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés. Ainsi, la séroprévalence élevée de la Belgique s'explique par l'emploi intensif de la vaccination à l'aide de vaccin vivant atténué [62].

Malgré cela, on peut schématiquement diviser les pays européens en quatre grandes catégories :

- Les pays ayant un taux de prévalence faible (inférieur à 5%) voire proche de zéro, comme le Danemark, la Suède, la Suisse et l'Autriche ;
- Les pays ayant un taux de prévalence moyen (de l'ordre de 10 à 30% de cheptels infectés) comme la France et peut-être l'Allemagne ;

- Les pays ayant un taux de prévalence élevé (supérieur à 60%) comme les Pays-Bas ou vraisemblablement la Belgique ;
- Les pays où la situation épidémiologique est inconnue comme la Grande-Bretagne, l'Espagne, l'Italie...

Ces chiffres peuvent recouvrir comme en France des différences de prévalence importantes entre les régions.

d. Différences de séroprévalence selon les caractéristiques des troupeaux

Une étude hollandaise a permis de connaître certaines relations statistiques existant entre les caractéristiques d'un troupeau et sa prévalence en IBR [137] :

- L'association entre l'introduction d'animaux et la prévalence est très faible dans les élevages de veaux de boucherie et de vaches allaitantes pour lesquels l'achat se fait très jeune (une semaine), mais elle est forte chez les éleveurs laitiers qui achètent leurs animaux plus âgés. Dans ce cas, l'achat semble être une importante voie d'introduction de la maladie.

- Les petits troupeaux ont une plus grande probabilité d'être indemnes ou faiblement positifs : moins d'animaux susceptibles de relancer l'infection et surtout des conditions de contention plus libres dans les grandes étables, un nombre de visiteurs (vétérinaires, inséminateurs, marchands, fermiers...) plus important et une pratique de la vaccination plus répandue qui fausse les données.

- Les troupeaux laitiers uniquement ont une prévalence plus faible que les élevages mixtes ou allaitants, ce qui est dû aux achats d'animaux venant de fermes différentes et transitant par des marchés avant leur arrivée. De plus, la vaccination est plus répandue dans les ateliers viande.

- Les zones à densité de fermes plus forte ont une prévalence plus élevée, alors que le nombre total d'animaux dans une même zone n'a pas d'importance significative.

e. Séroprévalence des animaux par cheptel

Les taux de prévalence par pays cachent des différences importantes à l'intérieur des cheptels. Une étude de séroprévalence en Wallonie montre la diversité des situations épidémiologiques possibles depuis la ferme presque séronégative jusque celles présentant un taux d'infection de presque 100% [62].

2. Epidémiologie analytique

a. Sources virulentes

Le BHV-1 est excrété dans les sécrétions respiratoires, oculaires et génitales du bovin infecté. La dose minimale infectante pour un bovin est très faible, de l'ordre de 3,2 DICT₅₀ après inoculation intranasale ou intravaginale par un virus sauvage [101].

Dans le domaine de la reproduction, les sources de contamination les plus importantes sont constituées par la semence des taureaux, notamment ceux appartenant à des centres d'insémination artificielle et par les embryons. La dilution de chaque éjaculat en de très nombreuses paillettes et la vente de ces produits dans un espace géographique très large peut entraîner une diffusion virale très importante.

b. Modalités de la contagion

La contamination s'effectue par voie aérienne lors de contact avec des animaux en phase d'excrétion virale, ceci constitue la voie actuelle de contamination principale.

Le deuxième mode de contamination est la voie génitale lors de saillie par un taureau ou celle d'une vache en phase d'excrétion (IPV), ou lors d'insémination artificielle avec une paillette contaminée.

c. Réceptivité

L'état immunitaire spécifique de l'animal qu'il soit naturel ou vaccinal n'interfère pas avec une contamination virale et son installation à l'état latent, mais prévient l'apparition de signes cliniques de la maladie [59].

3. Epidémiologie synthétique

a. Contamination

La voie de contamination principale en élevage reste donc par le jetage nasal des animaux en réexcrétion virale et surtout en primo-infection par contact direct, sur de courtes distances, par aérosolisation ou même par l'intermédiaire de vecteurs (mouchettes, cordes...). La dynamique de l'infection a été étudiée expérimentalement par Hage dans un troupeau laitier [48]. La circulation virale a été délibérément induite dans un troupeau dont la moitié des animaux étaient déjà séropositifs grâce à des injections de glucocorticoïdes (dexaméthasone) sur 3 animaux séropositifs provoquant une réactivation puis une réexcrétion virale chez ceux-ci. Tous les animaux séronégatifs du troupeau ont été infectés sur une période de 4 semaines. Un nombre moyen de 7 cas secondaires générés par un animal infecté a été calculé. Ce résultat démontre la rapidité de dissémination dans une population sensible.

Dans le domaine de la reproduction, la contamination par le sperme notamment reste marginale au sein d'un élevage. Elle prend toute son importance lorsque l'animal contaminé appartient à un centre d'insémination de par la quantité de paillettes contaminées produites potentiellement très importante et des conséquences commerciales qu'elles peuvent entraîner dans le cadre actuel de la certification d'élevage. De plus, cette excrétion se fait la plupart du temps sans aucun signe clinique et un animal contaminé lors d'une insémination peut transmettre l'infection à son entourage et donc être à l'origine d'une épidémie dans un élevage sans signe d'alerte [128, 130].

Certains animaux ont un rôle de contamination potentiellement très important dans le cadre actuel du dépistage sérologique : ce sont les animaux porteurs latents séronégatifs. Une

infection par un virus de virulence réduite peut avoir lieu avec établissement d'un état latent sans signature sérologique [47]. De même, l'infection d'un veau sous protection colostrale peut aussi conduire à la formation d'animaux porteurs latents faux-négatifs. A l'âge adulte, après réactivation parfois associée à une remultiplication virale, ces animaux séronégatifs infectés latents peuvent présenter une séroconversion, des symptômes cliniques et excréter le virus [61].

b. Maintien de l'infection

La présence d'animaux porteurs latents est l'élément essentiel de la persistance du virus au sein d'une population. Ces individus pourront infecter les congénères indemnes de leur troupeau lors d'une réactivation accompagnée d'une réexcrétion. La signification épidémiologique de la latence est donc de permettre le maintien de l'infection dans un groupe d'animaux sans apport exogène de virus.

L'IBR est une maladie virale à allure sporadique. L'incidence est faible quelle que soit la prévalence, faible ou élevée, au sein de l'élevage ou de la région considérée. L'infection subclinique est donc la plus fréquente dans les conditions d'élevage rencontrées en Europe [29]. La forme clinique de loin la plus fréquente est la maladie respiratoire (rhinotrachéite infectieuse bovine) qui touche les bovins de tous âges. La gravité des symptômes est très variable et le virus est associé au complexe multifactoriel des broncho-pneumonies enzootiques du veau. Les symptômes sont essentiellement : hyperthermie, abattement, congestion oculaire, jetage nasal, ptyalisme, chute de la production de lait [135] avec une guérison après 15 jours en l'absence de surinfection bactérienne avec cependant une mortalité possible avec certaines souches très virulentes [120]. Mais outre l'appareil respiratoire, le BHV-1 est aussi responsable de lésions importantes des organes reproducteurs, affectant ainsi la fonction de reproduction, aussi bien chez le mâle que chez la femelle.

II. BHV-1 et troubles de la reproduction

La forme génitale est due à une souche différente de celle responsable de la rhinotrachéite mais le tropisme n'est pas exclusif car les contaminations croisées sont possibles expérimentalement [34] et des formes mixtes ont déjà été décrites [83].

A. Infertilité mâle

Le BHV-1 est responsable d'une forme génitale de la maladie qui était la seule observée jusque dans les années 50 avant l'émergence de la forme respiratoire avec l'intensification de la production. Des épidémies de cette forme génitale sont toutefois encore observées de façon sporadique [83].

Les taureaux présentent une inflammation de la muqueuse génitale externe, avec un érythème et des vésicules évoluant en ulcères (balanoposthite pustuleuse du gland et du prépuce). Les animaux atteints présentent une pollakiurie due à l'irritation préputiale. Cette affection s'accompagne d'hyperthermie importante ($41,5^{\circ}$), mais l'évolution est généralement bénigne et la guérison est spontanée en 1 à 2 semaines avec cependant des surinfections bactériennes possibles. Certains animaux présentent de l'abattement et une baisse d'appétit durant la maladie. Il peut persister des adhérences préputiales dans les formes sévères, séquelle qui peut être limitée par un traitement antibiotique et antiseptique local [121].

La maladie entraîne une infertilité transitoire due au refus de saillir à cause de la douleur engendrée par les lésions [117], mais aussi une baisse de la qualité de la semence caractérisée par une mobilité réduite et des formes anormales des spermatozoïdes [14, 26, 50, 64, 73]. Il semblerait que cette baisse de qualité soit due aux conséquences de la maladie sur l'état général des taureaux plutôt qu'à une réplication du virus dans les testicules [14, 50]. D'autres auteurs ne trouvent pas de modifications de la qualité du sperme suite à l'infection [23, 50, 55, 142].

L'infection se transmet par voie sexuelle (maladie vénérienne) et la semence peut être contaminée par contact avec les lésions, d'où l'importance en saillie naturelle mais surtout chez des taureaux de centre d'insémination car la congélation n'élimine pas le virus [51].

B. Infertilité femelle

1. Vulvovaginite pustuleuse (IPV: Infectious Pustular Vulvovaginitis)

Cette affection constitue la forme génitale de la maladie chez la femelle. Les premiers symptômes sont des mictions fréquentes, la queue restant relevée à cause de la douleur en région périnéale. La vulve est tuméfiée, un écoulement vaginal peu important est présent et l'examen du vagin révèle des petites papules puis des érosions et des ulcérations sur la muqueuse. En l'absence de surinfections bactériennes, les animaux guérissent en 10 à 14 jours [51, 117]. La douleur occasionnée peut cependant parfois provoquer un prolapsus utérin par les efforts de poussée qu'elle entraîne [119].

L'infection se transmet par voie sexuelle (maladie vénérienne), par contact lors de la saillie ou par l'insémination artificielle avec du sperme contaminé, mais aussi par contacts non sexuels (contact muflle-vulve) [117].

2. Anomalies du fonctionnement ovarien

L'inoculation expérimentale de virus directement dans l'utérus permet de simuler l'insémination avec de la semence contaminée. Cette expérience provoque une sévère ovarite nécrosante avec atteinte des follicules, les lésions les plus marquées étant situées sur le corps jaune [68]. L'inoculation par voie intramusculaire et intraveineuse démontre que les tissus ovariens sont aussi sensibles à l'infection par la voie sanguine. Les lésions ovariennes lors de contamination intra-utérine semblent aussi être dues à la circulation du virus par le sang et non à un passage viral de l'utérus jusqu'aux ovaires, comme le montre l'absence de lésions de la partie crâniale des cornes utérines et de l'oviducte [68]. L'importance de ces lésions semble corrélée à la durée et à l'intensité de la virémie provoquée par l'infection [124].

Le corps jaune est le plus sensible à l'infection durant les 3 à 4 premiers jours suivant l'ovulation. Il se produit alors une nécrose étendue de celui-ci [70]. L'infection expérimentale réalisée par d'autres auteurs au 5^{ème}-6^{ème} jour du cycle ne permet en effet pas de retrouver de lésions ovariennes [41]. Les infections à partir du 7^{ème} jour ne produisent que quelques foyers de nécrose localisés montrant par là même que les lésions du corps jaune décroissent au fur et à mesure qu'augmente le délai entre œstrus et contamination [70].

Le dosage de la progestérone sanguine sur des vaches infectées au moment de l'œstrus montre une interruption du cycle. Les taux de progestérone restent très bas, à des taux incompatibles avec une gestation, ce qui est une conséquence de la nécrose sévère du corps jaune mais aussi des glandes surrénales qui sécrètent elles aussi cette hormone [69, 124]. Dans la plupart des cas, le cycle suivant est normal, mais certaines vaches ne retrouvent un cycle normal que 2 mois après [69]. Il ne semble pas persister de séquelles sur les fonctions ovariennes après guérison.

Une réactivation virale suite à cette infection ne semble pas provoquer de nouvelles lésions ovariennes [69].

Cette sensibilité des ovaires à l'infection a des conséquences sur les périodes de vaccination. Des vaccins à virus vivants modifiés peuvent en effet provoquer des lésions ovariennes [98, 125]. Les vaches ne devraient donc pas être vaccinées avec ce type de vaccin dans les deux mois précédant l'insémination ou la saillie, la période la plus à risque se situant juste avant l'œstrus. Lors de vaccination en même temps qu'une synchronisation des chaleurs par des prostaglandines avec insémination sur le cycle suivant, Chiang et al. observent des taux de gestation nettement plus faibles que ceux d'un lot témoin [21].

3. Métrites

L'inoculation directe de virus dans l'utérus, en plus de ses conséquences ovariennes provoque une endométrite nécrotique sévère du corps et de la partie postérieure des cornes de l'utérus, qui régresse sans traitement en une à deux semaines [69]. Cette endométrite est responsable d'échec à l'insémination et d'infertilité temporaire [137].

Toutefois, après cette première phase d'infection, il ne semble pas qu'il puisse y avoir de réactivation virale dans l'utérus, ce qui semble prouver que le BHV-1 n'est pas une cause d'infertilité à chaleurs normales (repeat-breeding) chez les bovins [71].

Les vaches autour du vêlage sont aussi très sensibles à l'infection, et les animaux subissant une césarienne développent très souvent une inflammation sévère du péritoine et de l'utérus (métrô-péritonite) [117]. Cette complication, souvent décrite dans les élevages de race Blanc-Bleu-Belge, est due à une infection primaire [120].

4. Mortalité embryonnaire

L'infection expérimentale de génisses 7 jours après la saillie provoque la dégénérescence et la mort de l'embryon, sur lequel on retrouve des particules virales par isolement viral, immuno-histochimie et microscopie électronique. Des génisses inoculées 14 jours après la saillie ne sont pas gravides et le cycle œstral suivant montre une ovulation 26 et 27 jours après la saillie prouvant une mortalité embryonnaire précoce et non un échec de la fécondation [70]. Cette mortalité embryonnaire ne semble pas pouvoir être imputée aux lésions du corps jaune qui sont minimales et très localisées après une infection plusieurs jours après l'œstrus. Celle-ci est plutôt due à une contamination directe du conceptus à partir de l'utérus ou à des modifications physiopathologiques de l'utérus dues à la phase aiguë de la maladie (fièvre...), la cause exacte restant à démontrer.

La contamination de blastocystes à zone pellucide intacte *in vitro* ne montre aucune différence significative de développement après transfert embryonnaire entre lot témoin et lot contaminé [94]. L'exposition virale *in vitro* à plusieurs souches de BHV-1 d'embryons récemment éclos provoque en revanche une dégénérescence embryonnaire rapide. Ceux-ci présentent une vacuolisation des cellules trophoblastiques avec accumulation de nucléocapsides dans le noyau et présence de particules virales entières dans le cytoplasme. Le dosage viral montre une multiplication de l'ordre de 10 à 50 fois selon les souches, ce qui prouve que si les embryons peuvent être infectés, leur aptitude à produire des particules virales reste modérée [17].

La réactivation virale, si elle est réalisable expérimentalement dans certains tissus génitaux (ovaires, oviducte), ne semble pas dans les conditions naturelles pouvoir être à l'origine de mortalité embryonnaire [71].

5. Avortement

▪ Pathogénie

L'inoculation expérimentale par voie intra-musculaire de femelles gravides provoque le passage transplacentaire du virus, l'infection et la mort du fœtus conduisant à l'avortement [22]. L'avortement est une séquelle d'une infection respiratoire et de la virémie qu'elle peut entraîner et non la conséquence de l'infection vaginale [99]. Même si une virémie s'observe après réactivation d'un virus latent, la latence virale n'est pas considérée comme un risque d'avortement [120]. Des avortements non spécifiques consécutifs à une forte hyperthermie sont parfois observés en cas d'infection primaire de la vache gravide.

Le fœtus est sensible à l'infection à tous les stades de gestation même si les avortements ont lieu très majoritairement dans le dernier tiers de gestation [107]. L'avortement peut avoir lieu de quelques jours jusqu'à 100 jours après l'infection [51]. Il semblerait que le virus persiste pendant quelque temps dans le placenta où il est à l'abri des anticorps maternels avant d'infecter le fœtus [79]. Le chemin pris par le virus des placentomes jusqu'au fœtus n'est pas connu, mais les lésions retrouvées de façon constante sur le foie laissent à penser que la voie sanguine par la veine ombilicale est la plus probable. Le fœtus meurt 24 à 48 heures après le début de son infection mais son expulsion est différée jusqu'à plusieurs mois après [52].

Après passage transplacentaire, le virus exerce son action cytolitique dans tous les organes du fœtus. Les lésions fœtales macroscopiques sont généralement cachées par une autolyse avancée du fœtus au moment de son expulsion. Toutefois, on peut souvent observer des foyers de nécrose dans le foie. D'autres foyers de nécrose de tailles diverses peuvent être présents dans d'autres organes tels que les poumons, les nœuds lymphatiques, les reins. Le cortex rénal est détruit et entouré d'un œdème périrénal sérohémostatique. A l'examen histologique, le foetus présente des lésions de nécrose multifocale généralisée, avec une réaction inflammatoire modérée. Ces lésions sont dues à des localisations du virus secondaire à une virémie maternelle [53].

Lors d'un passage viral dans un troupeau avec des femelles à différents stades de gestation, le taux d'avortement peut être de l'ordre de 25%, l'inoculation à des femelles séronégatives conduisant à des taux beaucoup plus élevés [51].

▪ Prévalence des avortements dus au BHV-1

Celle-ci est variable selon les pays et les différentes enquêtes.

Une étude canadienne dans l'Ontario montre ainsi une prévalence autour de 1% des avortements dont l'origine a pu être démontrée, loin derrière les causes bactériennes ou fongiques [3].

Une autre étude dans le Dakota portant sur 10 ans d'avortements montre une origine virale dans 10% de ceux-ci et le rôle de l'IBR pour la moitié d'entre eux. Cela en fait la première cause virale d'avortement à égalité avec le virus BVD (Bovine Viral Diarrhea). L'auteur constate toutefois une diminution de 50% des avortements dus à l'IBR durant ces 20 dernières années, probablement en relation avec une politique de vaccination intensive [54].

En Europe, plusieurs études montrent des pourcentages voisins, le BHV-1 étant impliqué dans 7 à 13% des avortements pour lesquels un diagnostic a pu être établi en Allemagne [140], 12,7% dans une étude anglaise dans le Lancashire [76]. Cette dernière enquête souligne toutefois l'importance des méthodes d'investigation. Une simple enquête sérologique avec prise de sang unique sans cinétique d'anticorps aurait conduit à une prévalence supérieure (20% des cas avec diagnostic), alors qu'une cinétique associée à un examen immuno-histologique du fœtus et des enveloppes a conduit au taux ci-dessus, soit environ la moitié.

6. Forme généralisée chez les veaux nouveau-nés

L'infection durant le dernier tiers de gestation peut conduire en plus des avortements à de la mortinatalité et des cas de mortalité de veaux dans les 12 jours qui suivent la naissance.

Le veau peut aussi se contaminer dans ses premiers jours de vie et succomber à une généralisation de l'infection notamment en cas de prise insuffisante de colostrum. La maladie débute 3 à 4 jours après la naissance et les veaux malades présentent de la toux, du jetage nasal, de l'épiphora, de la broncho-pneumonie, de la diarrhée, de l'hyperthermie et des ulcérations au niveau de la muqueuse linguale s'accompagnant de ptyalisme. Cette forme est rapidement mortelle. Des foyers de nécrose et des érosions de la muqueuse sont présents dans les cavités nasales, le foie, la rate, les reins, l'œsophage, les estomacs et l'intestin indiquant la généralisation de l'infection [51, 99, 118].

Le BHV-1 est aussi à l'origine d'encéphalites chez les jeunes animaux [67].

III. BHV-1, saillie naturelle et insémination artificielle

A. Excrétion du virus dans le sperme

1. Durée d'excrétion

Après une infection primaire, les taureaux peuvent excréter du virus à partir du fourreau pendant 2 à 7 jours après l'infection. Cette période est très variable d'un taureau à l'autre et les durées vont de plusieurs jours [26, 50, 128] à plusieurs semaines [13, 56, 106], alors que sur d'autres animaux, on ne retrouve même pas de particules virales [56].

Après cette phase d'excrétion primaire, il existe des phases d'excrétion secondaires du virus, intermittentes, qui peuvent avoir lieu jusqu'à plusieurs années après l'infection primaire [56]. Ces phases de réexcrétion peuvent être spontanées [100] ou être induites par des injections de corticoïdes [56, 91]. Ces périodes de réexcrétion sont la plupart du temps cliniquement inapparentes [128].

2. Quantité excrétée

C'est au cours de la phase d'excrétion primaire que l'on trouve les titres en particules virales les plus importants. Les titres trouvés varient entre 10^5 et $10^{8.5}$ DICT₅₀ par ml dans le sperme ou le liquide de lavement préputial lors d'épisode naturel ou expérimental de la maladie [13, 39, 100, 102]. Sur deux taureaux infectés expérimentalement, les titres en particules virales ont été trouvés supérieur dans le liquide de rinçage préputial que dans le sperme [13].

Lors de réexcrétion secondaire, naturelle ou induite expérimentalement, les titres viraux varient énormément, entre 10^1 et $10^{5.65}$ DICT₅₀ par ml de semence selon les auteurs [13, 28, 39, 142]. Ces différences de niveau d'excrétion s'expliquent sans doute par différents facteurs tels que : la voie d'inoculation, la virulence de la souche et la dose infectante pour le virus, l'âge de l'animal, son état général et des facteurs génétiques pour l'hôte.

Le sperme semble se contaminer plus probablement par le virus qui se réplique dans le mucus du prépuce ou du pénis que par une production directe dans les testicules, l'épididyme ou les glandes accessoires [100]. Par conséquent, la quantité de virus dans le sperme est comparable à celle du liquide de rinçage préputial [13]. Cependant, l'excrétion virale dans le liquide préputial n'aboutit pas nécessairement à une excrétion virale dans le sperme [56]. La localisation virale dans les spermatozoïdes eux-mêmes n'a pas pu être prouvée même si une expérience a montré la présence d'antigènes du virus BHV-1 au niveau de la zone post-nucléaire chez un taureau contaminé [36, 43, 126].

Il paraîtrait logique que la quantité de virus présente dans une paillette dépende de la quantité de virus présente dans l'éjaculat

stockage a déjà été rapportée [46, 57]. Le virus peut se conserver à 4°C pendant 7 jours et 5 jours à température ambiante. Une succession de 5 cycles congélation/décongélation n'altère pas le potentiel infectieux du virus [30].

B. Contamination par voie vénérienne

1. Dose infectante

La dose de virus nécessaire pour infecter une vache par insémination artificielle n'est pas exactement déterminée. Une séroconversion a été observée 14 jours après insémination chez 6 animaux sur 25 inséminés avec une paillette contenant de petites quantités de virus (inférieures à 200 DICT₅₀) [88]. Une autre expérience ne trouve aucune séroconversion sur 44 vaches inséminées avec des paillettes contenant 32 DICT₅₀ [39].

L'insémination artificielle de vaches avec des doses plus élevées ($10^{5,3}$ DICT₅₀) provoque une infection entraînant notamment une endométrite et de l'infertilité transitoire [68]. La quantité de virus nécessaire pour développer une infection dépend probablement de la virulence de la souche virale et de la quantité de virus infectant, une souche plus virulente nécessitant une dose infectante plus faible [141].

2. Conséquences cliniques

L'insémination artificielle avec de la semence contaminée peut être à l'origine de faibles taux de gestation accompagnés d'un raccourcissement de la durée du cycle ovarien, de vulvovaginites et d'endométrites [87, 138]. D'autres auteurs ne constatent qu'une infection subclinique avec toutefois un échec à la conception. Cette infection, même subclinique, peut être à l'origine de la dissémination du BHV-1 dans un élevage [129].

Lors de saillie naturelle, la contamination de la semence ne semble pas affecter la fertilité [129, 138]. Il subsiste toujours toutefois le risque de transmission de l'IPV.

Les embryons issus de la fécondation avec de la semence contaminée ne sont pas eux-mêmes contaminés [87].

IV- BHV-1 et transfert embryonnaire

A. Matières infectieuses

1. Sperme

Le BHV-1 est présent dans la semence de taureau à des concentrations variables lors d'excrétion primaire ou secondaire et son infectiosité n'est pas affectée par le stockage dans l'azote liquide (cf. supra). Toutefois, une expérience montre que des embryons issus d'insémination avec de la semence fortement contaminée peuvent ne pas être eux-mêmes contaminés [87].

2. Gonades et tractus génital femelles

Le BHV-1 peut être présent à la suite d'une infection naturelle ou expérimentale dans différentes parties de l'ovaire : fluide folliculaire, granulosa, stroma, cellules du cumulus et ovocytes. La contamination fréquente des liquides folliculaires et des cellules de la granulosa montre que le virus peut infecter l'ensemble du follicule bien avant son ovulation [41].

Les ovocytes contaminés représentent un vecteur potentiel de la maladie à l'occasion de transfert embryonnaire, que la fécondation ait lieu *in vivo* ou *in vitro*, même si leur infection diminue les taux de développement embryonnaire [9, 41].

Ainsi, lorsque les ovocytes sont prélevés sur des ovaires collectés à l'abattoir sur des vaches de statut sanitaire inconnu, la présence du BHV-1 est détectée dans les embryons obtenus *in vitro* malgré un nombre de lavages conforme aux recommandations de l'IETS (International Embryo Transfer Society) [10].

Le reste du tractus génital est lui aussi contaminé et notamment l'oviducte qui pourra représenter une source d'infection pour les ovocytes mais aussi les embryons fécondés *in vitro*, qui sont mis, dans certains systèmes de production d'embryons *in vitro*, en co-culture sur des cellules d'oviductes bovins prélevés à l'abattoir [41].

3. Embryons

Les virus ne traversent pas la zone pellucide de l'embryon, et il est généralement accepté que la seule voie de transmission est l'adsorption virale sur celle-ci [4], le BHV-1 présentant une forte affinité pour la zone pellucide comparativement à d'autres virus [38, 94].

La zone pellucide des ovocytes apparaît plus poreuse en microscopie électronique et retient beaucoup plus de particules virales après exposition *in vitro* que les embryons de 7 jours sans que les raisons en soit totalement connues [84]. Le diamètre des pores au moment de leur dilatation maximum pourrait permettre en théorie le passage de particules virales de la taille du BHV-1 (200 nm). Toutefois, le diamètre du passage décroît de façon centripète jusqu'aux cellules embryonnaires rendant le passage impossible. Ceci est confirmé par une expérience utilisant des sphères fluorescentes de la taille des particules virales. Celles-ci, mises en contact avec l'embryon ne pénètrent que dans le quart externe de la zone pellucide.

Cependant, avec les remaniements de celle-ci au cours du développement embryonnaire, il y a un risque de piégeage viral dans les couches les plus externes [134].

a. Embryons obtenus *in vivo*

L'infection expérimentale de vaches par le BHV-1 provoque la contamination des ovaires, de l'oviducte et de l'utérus, laissant suspecter que la transmission pourrait se faire durant la phase aiguë de la maladie. Les embryons issus de cette contamination sont capables de se développer et donc susceptibles d'être transférés.

La contamination expérimentale *in vitro* de ces embryons et un nombre de lavages insuffisant suivi de leur implantation chez des receveuses saines permet l'isolement viral dans certains tissus de la receveuse (vagin, utérus, ovaires, rate) et même dans le sang, sans toutefois provoquer de séroconversion [87]. De plus, les expériences de contamination *in vitro* tendent à exagérer le risque de contamination et de transmission virale comparativement aux expériences de contamination *in vivo* qui sont un meilleur reflet de ce qui peut se passer dans les conditions naturelles.

Malgré cette possibilité d'adsorption virale, le risque de transmission est classé catégorie 1 par l'IETS, c'est-à-dire considéré comme négligeable sous condition de récolte et de transfert correctement effectués selon les recommandations de l'IETS [77]. De nombreuses études montrent que les techniques standard de lavage des embryons après leur collecte (dix bains successifs, avec une dilution au 1/100^{ème} entre chaque bain) permettent d'éliminer le virus de la surface des embryons produits *in vivo* avec toutefois un traitement supplémentaire nécessaire à la trypsine [4].

Dans les conditions naturelles, la contamination des embryons produits *in vivo* a toutefois peu de chances de se réaliser car la phase aiguë correspondant à celle de l'excrétion virale est très courte [9, 41]. Une autre expérience portant sur 64 embryons collectés à partir d'animaux virémiques et transférés sur des receveuses séronégatives après lavages et traitement à la trypsine n'a montré aucune séroconversion, les veaux obtenus étant eux-mêmes séronégatifs [95]. L'observation de Thibier et Nibart [108] va également dans le sens de la rareté de la transmission lors de transfert d'embryons collectés *in vivo* : aucune séroconversion n'a été constatée chez 1274 vaches ayant reçu des embryons issus de vaches majoritairement séropositives [108].

b. Embryons obtenus *in vitro*

Le risque de contamination des embryons obtenus par fécondation *in vitro* semble plus important que ceux obtenus *in vivo*, l'environnement et les caractéristiques de ces deux catégories d'embryons étant différentes (tableau I).

Tableau I : Différences environnementales, morphologiques et physiologiques entre les embryons produits *in vivo* et *in vitro* (d'après [4]).

Caractéristiques	Embryons produits :	
	In vivo	In vitro
Maturation	Folliculaire	En culture
Fécondation	Oviducte	En culture
Développement	Oviducte/Utérus	En culture
Viabilité	Meilleure	Moins bonne
Cryopréservation	Meilleure	Moins bonne
Réaction corticale	« Normale »	Retardée
Protéines tubaires/zone pellucide (ZP)	Présentes	Absentes
Résistance de la ZP à la pronase	Plus importante	Plus faible
Propriétés antigéniques de la ZP	Différentes	Différentes
Espace périvitellin	Plus grand	Plus petit
Compaction	Meilleure	Moins bonne
Nombres de cellules	Plus élevé	Plus faible
Taux de développement	Plus rapide ou identique	Plus lent ou identique
Anomalies chromosomiques	2%-20%	10%-45%
Fécondation polyspermique	Moins importante	Plus importante
Couleur	Plus claire	Plus sombre
Densité de flottaison	>1,30	<1,14
Mortalité embryonnaire et fœtale	Plus faible	Plus élevée

Le premier risque provient de la contamination possible des milieux de maturation, fécondation et de culture qui contiennent des liquides biologiques et des lignées cellulaires potentiellement contaminées.

Le second vient du fait que la composition de la zone pellucide est différente et ne contient pas de glycoprotéines provenant de l'oviducte contrairement aux embryons produits *in vivo*. Le virus serait donc susceptible de s'attacher plus facilement à la zone pellucide des embryons produits *in vitro*.

On distingue deux modalités de contamination pour les embryons produits *in vitro* : le cas où la contamination a lieu *in vivo* et intéresse l'ovocyte et le cas où l'embryon est contaminé *in vitro* au cours des procédures allant de la maturation ovocytaire *in vitro* à l'embryon cultivé transférable.

α. Contamination *in vivo*

Les ovocytes contaminés obtenus après infection expérimentale simulant une primo-infection sont capables de se développer pour donner des embryons eux-mêmes contaminés. De plus, les cellules de l'oviducte (préparées à partir de vaches saines), sur lesquelles ont été cultivés ces embryons contaminés *in vivo* ont été contaminées à leur tour démontrant que les particules virales sur les embryons peuvent infecter les cellules environnantes. Ceci montre le potentiel contaminant de tels embryons même si le taux d'embryons obtenu dans ces conditions est significativement plus bas que la normale [11, 41].

Dans les conditions naturelles, cette contamination ovocytaire a toutefois peu de chances de se produire car la phase aiguë, correspondant à celle de l'excrétion virale, est très courte. Ainsi, Bielanski et al. n'ont obtenu qu'un taux de contamination de 2,4% sur 759 embryons obtenus *in vitro* à partir d'ovaires positifs pour le BHV-1 [10]. De même, aucune contamination embryonnaire n'a été observée après une épreuve de réexcrétion virale (induite par des injections répétées de dexaméthasone à des vaches séropositives) et collecte des ovocytes [11]. Ceci est en accord avec des expériences précédentes montrant une réexcrétion nasale et vaginale de virus suite à des injections de glucocorticoïdes sans lésions ovariennes [69]. Le risque semble donc encore plus faible lors de réexcrétion virale que lors de primo-infection. D'autre part, le risque de contamination lors de ponction d'ovocytes réalisée sur des donneuses séropositives semble également très faible : aucun fluide folliculaire ni aucun milieu de culture n'a été trouvé infecté [5, 136].

β. Contamination *in vitro*

Plusieurs expériences montrent le développement possible d'embryons après contamination *in vitro* avec des taux de développement variables selon les auteurs. De plus, celles-ci montrent que l'élimination du BHV-1 de ces embryons ne peut être obtenue malgré de nombreux lavages correspondant aux traitements auxquels les embryons sont habituellement soumis avant d'être cultivés et transférés, ni même par le retrait des cellules du cumulus de l'ovocyte [9, 42].

De plus, on peut noter que les techniques de clonage et de sexage des embryons sont des techniques qui nécessitent l'incision ou tout au moins la perforation de la zone pellucide : elles pourraient donc exposer les cellules embryonnaires elles-mêmes au BHV-1.

Ces différences rendent nécessaire de réévaluer pour les embryons produits *in vitro* (et micro-manipulés) l'efficacité des recommandations de traitement des embryons de l'IETS pour les embryons collectés *in vivo*.

4. Milieux de maturation et de culture

Le virus BHV-1 est un contaminant habituel du sérum de veau fœtal, couramment utilisé lors de production et de culture d'embryons *in vitro*, mais aussi pour de nombreuses cultures cellulaires [45].

La contamination peut aussi théoriquement provenir des tapis de cellules épithéliales sur lesquels peuvent être cultivés les embryons. Ces cellules sont obtenues à partir de primoculture de cellules d'oviducte ou de cumulus prélevées en abattoir et non contrôlées sur le plan sanitaire. Toutefois, une expérience de culture d'embryons sains sur des cellules d'oviducte infectées ne montre aucune contamination embryonnaire après 7 jours de culture [41]. Bien que les cellules de l'oviducte paraissent aussi sensibles que certaines cellules de référence (rein de fœtus de veau, Lignée Bovine Turbinate), il semblerait toutefois que le BHV-1 n'entraîne pas toujours d'effet cytopathique sur les cellules tubaires. Le BHV-1 semble même disparaître de ces cellules, puisqu'il n'est plus détecté après 13 à 14 jours de culture, dans des cellules qui étaient initialement infectées le jour de l'ovariectomie. La faible contamination initiale de ces cellules pourrait réduire les contacts virus-effecteurs membranaires, rendant de ce fait plus aléatoire la pénétration des particules virales à l'intérieur des cellules et donc leur multiplication. La faible résistance du virus dans le milieu extérieur pourrait expliquer ultérieurement la disparition progressive du virus dans ces conditions de culture [41].

B. Conséquences d'une contamination par le BHV-1 pour la production d'embryons

1. Rendements

a. *In vivo*

La contamination expérimentale (par voie intra-nasale) au moment de l'insémination de donneuses d'embryons ayant subi un protocole de superovulation provoque une baisse très importante du nombre d'embryons produits par celles-ci [87]. Cette baisse semble pouvoir être mise en rapport avec la fièvre engendrée par l'infection, les vaches répondant le moins bien à la superovulation étant celles infectées plusieurs jours avant l'ovulation avec un pic fébrile au moment de celui-ci [95].

Les vaches donneuses d'embryons ont toutefois statistiquement peu de chances d'être en phase aiguë de la maladie à ce moment précis et donc de subir une baisse de rendement. Dans le cas d'infections plus anciennes, on ne trouve en effet pas de différences significatives dans le nombre d'embryons produits entre des donneuses séropositives et séronégatives vis-à-vis du BHV-1 [18].

b. *In vitro*

α. Maturation

Le virus semble pouvoir entraîner des anomalies de la maturation des ovocytes (anomalies du fuseau de métaphase II) sans que celles-ci n'entraînent de baisse du taux de maturation [42].

β. Fécondation

La contamination des ovocytes entraîne une réduction très significative du taux d'ovocytes fécondés *in vitro*, ainsi qu'une augmentation également très significative des anomalies de décondensation des spermatozoïdes [42]. Ces anomalies pourraient être dues à la pénétration de particules virales dans les cellules embryonnaires à la faveur de l'ouverture de la zone pellucide au moment de la pénétration du spermatozoïde. Les anomalies de décondensation des spermatozoïdes pourraient donc être dues à un effet cytopathique du virus, empêchant la fusion gamétique [17, 69, 70].

Ces résultats sont en contradiction avec d'autres expériences qui montrent l'impossibilité pour le BHV-1 de pénétrer à l'intérieur de l'ovocyte que celui-ci soit intact ou dépellucidé [132]. Pour expliquer la baisse du taux de fécondation en présence du BHV-1, Vanrose et al. émettent l'hypothèse d'une action des particules virales sur les spermatozoïdes, d'une action directe empêchant la fusion gamétique par fixation sur le spermatozoïde lui-même, ou d'une action indirecte par captation de l'héparine empêchant celle-ci de participer à la capacitation des spermatozoïdes [133].

γ. Développement

Plusieurs auteurs montrent que des embryons obtenus après fécondation *in vitro* d'ovocytes récoltés sur des vaches infectées expérimentalement entre 7 et 10 jours auparavant ont des taux de développement embryonnaire significativement plus faibles que des embryons issus de vaches non infectées [11, 41]. Une autre expérience d'exposition virale *in vitro* à différents stades de production (maturation, fécondation, co-culture) d'embryons à zone pellucide intacte montre des taux de développement significativement diminués [133].

Les propriétés cytotoxiques du BHV-1 pourraient donc être responsables des phénomènes de mortalité embryonnaire précoce observés lors des infections expérimentales effectuées avec ce virus [17, 69, 70]. Une autre hypothèse attribue cette baisse du taux de développement à la période fébrile post-inoculation virale [11].

Toutefois, les études portant sur l'action directe *in vitro* des particules virales sur l'ovocyte ou l'embryon ne semblent pas indiquer que ces baisses des taux de développement soient dues à un effet cytotoxique direct sur l'ovocyte ou l'embryon. En effet, si les particules virales peuvent se multiplier dans les embryons dépellucidés à partir du stade 8 cellules, on ne constate aucune multiplication virale sur les embryons à zone pellucide intacte montrant par là même le rôle de barrière très efficace de celle-ci [133]. Une autre expérience ne trouve pas de différence significative de survie entre des embryons à zone pellucide intacte et simplement lésée, montrant que la zone pellucide même lésée semble avoir un rôle protecteur [6].

En l'absence d'effets cytopathiques sur l'ovocyte et l'embryon, Vanrose et al. émettent l'hypothèse pour expliquer la baisse du taux de développement des embryons une action lytique des particules virales sur les cellules somatiques environnantes : cellules du cumulus et cellules nécessaires à la co-culture. Le remplacement des cellules de l'oviducte par un milieu semi-défini (S.O.F : Synthetic Oviduct Fluid) permet d'ailleurs de retrouver des taux de développement embryonnaires comparables à ceux obtenus sans contamination virale [133]. Une autre expérience d'exposition virale *in vitro* d'ovocytes montre l'impossibilité

d'arriver au stade blastocyste en relation avec la dégénérescence des cellules folliculaires épithéliales qui subissent l'effet cytopathique du BHV-1 [123].

D'autres expériences ne retrouvent pas ces baisses des taux de développement des embryons après exposition *in vitro* des ovocytes, ceci étant probablement dû à une souche différente de BHV-1 ou à un protocole de fécondation *in vitro* différent [9, 94].

2. Taux de gestation

Connaissant le pouvoir pathogène du BHV-1 lors d'inoculation intra-utérine (cf supra), il eût été intéressant de connaître les taux de gestation engendrés par l'implantation d'embryons contaminés par rapport à l'implantation d'embryons sains. On ne dispose pas aujourd'hui de chiffres précis permettant de comparer ces deux cas de figure.

3. Conséquences pour la receveuse et le nouveau-né

Il existe à ce jour peu de données sur le pouvoir contaminant du BHV-1 sur le veau issu d'un embryon contaminé et sur la receveuse de cet embryon.

Toutefois, la contamination d'embryons de 7 jours fécondés *in vitro* suivie de leur implantation après un nombre de lavages insuffisants à 3 femelles receveuses a entraîné la contamination de 2 d'entre elles [87].

Une autre expérience portant sur 64 embryons collectés chez des animaux virémiques et transférés sur des receveuses séronégatives après lavages et traitement à la trypsine n'a montré aucune séroconversion, les veaux obtenus étant eux-mêmes séronégatifs [95].

V- Méthodes de diagnostic

L'épidémiologie et la clinique ne sont pas assez spécifiques pour permettre à elles seules de diagnostiquer un épisode d'IBR dans un élevage, et le rôle essentiel des porteurs latents sans signes cliniques nécessite le recours aux examens de laboratoire.

A. Diagnostic de laboratoire

1. Diagnostic direct

Pour vérifier une suspicion, le diagnostic de certitude reste la mise en évidence du virus lui-même ou de ses déterminants antigéniques. La méthode de choix, de par sa sensibilité, est l'isolement du virus sur cellules suivi de l'identification des souches isolées par séroneutralisation ou le plus souvent par immunofluorescence. Lorsque la qualité des prélèvements est moins bonne, et que la viabilité des particules virales n'est pas assurée, l'isolement peut être remplacé par la recherche des antigènes spécifiques du BHV-1 le plus souvent par immunofluorescence sur coupes de tissus congelés ou frottis cellulaires. Cette technique, plus simple, est cependant moins sensible [65].

La recherche de fragments d'ADN spécifiques du BHV-1 par hybridation (dot-blot, Southern blot) après amplification génomique (PCR : Polymerase Chain Reaction) verra probablement son utilisation s'accroître dans la pratique courante, compte-tenu de ses avantages par rapport à l'isolement viral : sensibilité comparable, délai d'obtention des résultats plus court, détection possible des animaux porteurs du virus IBR à l'état latent, viabilité du virus non obligatoire. Cette technique n'est toutefois pas actuellement à la portée des laboratoires de diagnostic courant [65].

2. Diagnostic indirect

Lorsqu'il s'agit d'un diagnostic et non d'un simple contrôle, il est essentiel de réaliser sur les animaux malades une première prise de sang dès l'apparition des symptômes et une seconde prise de sang 2 à 3 semaines après pour réaliser une cinétique d'anticorps. Une série de prises de sang sur les animaux cliniquement normaux en contact étroit avec les animaux malades est un complément diagnostique intéressant. Le test de référence lors de diagnostic d'une affection aiguë est la séroneutralisation, méthode lourde mais la plus sensible [65].

Pour la réalisation des contrôles s'inscrivant dans le cadre de plans sanitaires ou de transactions commerciales, les techniques ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sont les plus adaptées car applicables à différents types de prélèvements (sérums ou laits, en mélange ou individuels) et faciles à mettre en œuvre dans les laboratoire de diagnostic [65]. L'apparition de tests ELISA Compétition permettant de différencier des animaux infectés d'animaux vaccinés avec des vaccins délétés représente un atout supplémentaire, même si ceux-ci n'ont pas encore de valeur officielle (cf infra).

Les tests ELISA disponibles ont des performances et des sensibilités très variables. Pour améliorer ceci, l'Union Européenne a défini 3 sérums de référence, communs à l'ensemble des pays européens, le standard faiblement positif permettant de mieux cadrer le niveau de détectabilité des test ELISA lors de leur mise au point et de le vérifier en cours

d'application. Ceci devrait permettre de réduire fortement l'incidence de résultats paradoxaux qui ont parfois perturbé le déroulement des campagnes de dépistage.

Les tests ELISA sur lait de tank ne sont intéressants que dans le cadre de contrôle. La sensibilité est en effet très diminuée avec la dilution. Le taux de conversion du lait d'un cheptel négatif qui introduit un animal séropositif n'est que de 10 à 25% pour un cheptel de 45 laitières. Ce chiffre dépend beaucoup de la quantité de lait produite par l'animal introduit. Le passage d'un lait de tank du statut de négatif à positif au BHV-1 est donc plus sûrement le signe d'une circulation virale dans le cheptel [37].

B. Détection du BHV-1 en cas d'avortement

Il n'y a pas de lésions macroscopiques pathognomoniques du BHV-1 ni sur l'avorton, ni sur le placenta [54].

L'examen histologique seul qui montre des lésions de nécrose multifocale dans différents organes (foie, nœuds lymphatiques, poumons, reins, placenta) ne constitue pas non plus une certitude sur l'origine de l'avortement. Kirkbride souligne toutefois l'aspect quasi-pathognomonique des lésions de nécrose hépatique [54]. Ces lésions sont visibles même en cas d'autolyse assez avancée de l'avorton.

Le diagnostic immuno-histochimique utilisant des anticorps monoclonaux fluorescents sur des sections de reins congelés d'avortons est un examen très fiable, les faux-positifs résultant le plus souvent d'examens sur d'autres organes que les reins [54].

L'isolement viral est une méthode moins fiable que celles utilisant des anticorps monoclonaux [99]. Cette méthode est notamment gênée par l'autolyse avancée qui caractérise les avortons dont l'avortement est dû au BHV-1. Elle ne permet un diagnostic que dans 33 à 50% des cas où le BHV-1 est mis en cause par d'autres méthodes [54]. L'isolement peut être réalisé sur différents organes et tissus : placenta, foie, reins, rate, poumons, liquide amniotique et abomasal [78]. Cet isolement est plus facilement réalisé sur le placenta que sur l'avorton. En effet, le titre viral décline dans le fœtus à partir de sa mort jusqu'à son expulsion qui peut se produire jusqu'à 7 jours après celle-ci. En revanche, le titre viral reste stable et peut même s'accroître dans le placenta durant cette même période [52]. L'isolement viral est en revanche plus efficace que l'immunofluorescence pour le diagnostic de l'IBR sur les veaux contaminés en fin de gestation morts-nés ou morts quelques jours après leur naissance [54].

Un diagnostic basé uniquement sur une cinétique d'anticorps chez la mère ne suffit pas à prouver le rôle du BHV-1 dans un épisode d'avortements comme le montre l'enquête épidémiologique de Murray combinant sérologie et examen immuno-histologique : les sérologies seules auraient conduit à des diagnostics en excès [76]. Ceci est confirmé par une expérience d'avortements provoqués qui ne montre pas d'augmentation significative du taux d'anticorps séroneutralisants [25]. L'examen sérologique d'une dizaine d'animaux au contact d'une vache ayant avortée peut en revanche être une aide utile au diagnostic [99].

L'examen sérologique du fœtus avorté est inutile. Quoiqu'immunocompétent, si l'avortement a lieu après 5 mois de gestation, sa mort est trop rapide après l'infection virale pour entraîner une réponse sérologique [51].

C. Détection du virus dans les paillettes de sperme

1. Méthodes *in vitro*

La semence est contaminée le plus souvent par du virus contenu dans le mucus préputial ou pénien. C'est donc le liquide séminal, plutôt que les spermatozoïdes, qui contient les particules virales. Cependant, les particules virales peuvent adhérer sur ceux-ci, en particulier à la tête des spermatozoïdes sans pénétration à l'intérieur de ceux-ci [43, 126].

Il existe plusieurs méthodes de détection du virus dans les prélèvements de semence. La difficulté de l'isolement viral, méthode habituelle, provient de la toxicité cellulaire propre du liquide séminal nécessitant la dilution du prélèvement afin d'identifier la cytotoxicité virale. Cette dilution entraîne une baisse de sensibilité des tests. Il en est de même pour la semence congelée, fortement diluée pour permettre la réalisation de nombreuses paillettes, entraînant une diminution de la sensibilité par rapport à la semence fraîche [127].

Les résultats obtenus pour le seuil de détection par isolement viral sont très variables selon les auteurs. Ces différences sont probablement dues aux enzymes protéolytiques (telle que l'acrosine) ou d'autres constituants neutralisant le virus présents en quantité très variable dans les différents éjaculats [7]. Il semblerait toutefois aujourd'hui que les méthodes les plus sensibles soient l'isolement viral et la méthode PCR (détection de 1 DICT₅₀/100µl de suspension), ces deux méthodes étant plus sensibles que la méthode par hybridation « dot blot » (détection de 20 000 DICT₅₀/100µl de suspension) [144]. Une hybridation par Southern blot à la suite d'une PCR permet d'abaisser le seuil à 0,01 DICT₅₀/100µl de suspension. D'autres auteurs montrent une sensibilité plus importante de la méthode PCR (détection jusqu'à 0,001 DICT₅₀/50µl) avec toutefois une interrogation sur le potentiel contaminant réel des échantillons positifs en PCR et négatifs en isolement viral (détection d'ADN viral et non de particules virales infectieuses) [85, 139]. La méthode PCR sur semence fraîche paraît pouvoir devenir un jour une méthode de référence, celle-ci présentant un coût relativement faible, une réalisation facile et une rapidité d'obtention des résultats importante (24 heures).

2. Méthodes *in vivo*

Il existe une méthode alternative, *in vivo*, permettant de tester un grand nombre d'échantillons de semence : le « Cornell semen test ». Cette méthode consiste en l'inoculation intranasale et intraveineuse d'échantillons groupés de sperme à des veaux séronégatifs à qui l'on fait une prise de sang 3 et 5 semaines après pour voir s'ils ont séroconverti. Les avantages de cette méthode sont sa simplicité, sa sensibilité (de l'ordre de 10³ DICT₅₀), son faible coût et la possibilité de tester des échantillons groupés. Les inconvénients sont la nécessité d'utiliser des animaux pour ces expériences, que ces animaux soient séronégatifs (avec donc la nécessité de les renouveler si ils séroconvertissent), de devoir les maintenir isolés des contaminations extérieures mais aussi le temps assez long nécessaire pour l'obtention des résultats et l'impossibilité de savoir quel échantillon est contaminé en cas de résultat positif [89].

Il a été rapporté un cas de contamination d'un troupeau indemne par les paillettes importées d'un taureau séronégatif avant la collecte de sa semence et dont les échantillons congelés de chaque éjaculat avait été testés *in vitro* par les pays exportateur et importateurs de

sa semence. Le « Cornell semen test » a permis de montrer la contamination du sperme et par conséquent la fiabilité parfois incertaine des tests *in vitro* [58].

VI. Prophylaxie

A. Prophylaxie sanitaire

1. Contrôle à l'introduction

Pour rester indemne, un cheptel ne doit introduire que des animaux séronégatifs lors de la visite d'achat car il est actuellement impossible de différencier un animal vacciné d'un animal contaminé (à l'exception de la vaccination par un vaccin délété dont le test n'a pour l'instant pas de valeur officielle). Cette condition fait partie du cahier des charges de l'acquisition et du maintien en appellation A ou appellation B de la certification par l'ACERSA (association pour la certification de la santé animale en élevage) de cheptel indemne d'IBR [31]. A terme, les élevages certifiés indemnes ne pourront acheter d'animaux qu'à d'autres élevages certifiés indemnes d'IBR.

Une limite importante de cette méthode est constitué par les animaux faux-négatifs. En France, parmi tous les taureaux séronégatifs importés du Canada et des Etats-Unis, entre 1972 et 1980, 3% se sont révélés être de faux négatifs, ces animaux ayant montré une séroconversion parfois plusieurs années après leur introduction dans les centres d'insémination artificielle [32]. Ces animaux faux-négatifs peuvent être dépistés avec plus de certitude par l'association de la sérologie avec d'autres méthodes de diagnostic : test intradermique ou réactivation du virus par traitement corticoïde de réalisation plus délicate en pratique courante [115].

L'importance de ces animaux dans les transactions entre élevages devrait être limitée par le fait qu'à terme, les élevages certifiés indemnes (appellation A) ne pourront acheter d'animaux qu'à d'autres élevages certifiés indemnes d'IBR, donc ayant peu de chances de contenir des faux-négatifs.

2. Contrôle des taureaux de centre d'insémination artificielle

L'admission des taureaux en centre d'insémination artificielle est soumise à des conditions précises en matière d'IBR par la législation (arrêté du 12 Juillet 1994 JO n°185) : quarantaine de 2 mois dans une station de quarantaine agréée par le Ministère de l'agriculture et de la pêche, 2 épreuves de séroneutralisation ou 2 épreuves ELISA négatives à l'égard de l'IBR/IPV, l'une au cours des 30 premiers jours de la période, l'autre au cours des 30 jours suivants. Par la suite, un examen sérologique par an qui devra se montrer négatif.

Le contrôle des reproducteurs est actuellement la méthode la moins onéreuse et la plus rapide pour s'assurer de la qualité sanitaire de la semence [96].

Certains centres réalisent en plus un test à la dexaméthasone qui permet de révéler les porteurs latents. Ce test comprend 5 injections de dexaméthasone à 0,1 mg/kg 5 jours consécutifs et des prélèvements préputiaux, nasaux et sanguins répétés. Le test diminue toutefois significativement et de façon réversible la qualité de la semence obtenue pendant une période de 60 jours suivant sa mise en œuvre. Il en résulte une diminution importante de la production de doses : chez les taureaux testés, 24% seulement des éjaculâts, contre 66% chez les taureaux non testés, permettent de produire plus de 100 doses congelables. Cette diminution serait due à l'action inhibitrice de la dexaméthasone sur les sécrétions de LH et de

testostérone, ces hormones contrôlant l'ensemble de la spermatogenèse et du transit épидидymaire. Le stress dû à la multiplication des injections et prélèvements joue aussi sans doute un rôle. Ce test, en plus de son coût propre (environ 300 euros par animal testé) présente donc plusieurs inconvénients qui limitent sa réalisation avec notamment une augmentation des coûts de production (retard dans la production de semence et allongement de 3 mois environ de la durée d'entretien du taureau) et une limitation de l'entrée d'autres taureaux puisque les boxes sont occupés plus longtemps. De plus, les risques de dissémination virale entre animaux soumis au test sont non négligeables même en prenant les précautions sanitaires les plus strictes [97].

3. Contrôle des donneuses d'ovocytes et des receveuses d'embryons

La législation française impose l'absence de manifestation clinique d'IBR-IPV depuis au moins un an au sein du cheptel de la femelle donneuse d'ovocytes par ponction folliculaire échoguidée (« Ovum Pick Up ») ou de la femelle donneuse d'embryons (arrêté du 13 Juillet 1994). Il en va de même pour les femelles receveuses. Cette réglementation n'est pas imposée aux femelles abattues qui donnent leurs ovocytes à l'abattoir pour lesquelles la seule exigence est « qu'elles ne soient pas abattues dans le cadre d'un programme national d'éradication d'une maladie animale et ne proviennent pas d'une exploitation faisant l'objet de mesures de restriction pour des motifs de police sanitaire ». La différence de traitement entre les différentes donneuses d'ovocytes n'est pas sanitaire justifiable.

Les femelles donneuses doivent de plus « ne présenter, le jour de la collecte, aucune lésion de l'appareil génital, ni signe clinique de maladie ».

Dans tous les cas, la semence doit provenir d'un taureau « satisfaisant aux conditions sanitaires exigées pour la monte publique artificielle » donc indemne d'IBR.

L'utilisation de reproducteurs indemnes séronégatifs uniquement pose le problème des régions ou pays où l'IBR est endémique mais dont les animaux possèdent un potentiel génétique intéressant [19]. Le problème est identique pour les pays à politique de forte vaccination. Des dispositions particulières ont donc été mises en place pour moduler les dispositions générales. Compte-tenu des garanties offertes par la technique de transplantation embryonnaire en matière de prophylaxie sanitaire et sous réserve de la stricte application des prescriptions relatives au déroulement de la phase *in vitro*, des dérogations particulières concernant le statut sanitaire des femelles donneuses peuvent être accordées. Ces demandes transmises avec l'avis circonstancié du directeur des services vétérinaires à la Direction Générale de l'Alimentation – Sous Direction de la Santé et de la Protection Animale sont examinées au cas par cas en fonction des intérêts génétiques à préserver (arrêté du 13 Juillet 1994).

4. Contrôle des semences

La législation (arrêté du 12 Juillet 1994 JO n°185) exige que chaque dose sperme soit munie d'une marque apparente permettant d'établir le statut sérologique en IBR/IPV de l'animal donneur. Les échanges intra ou extra-communautaires de sperme de taureaux vaccinés sont possibles avec toutefois obligation de réaliser un test d'isolement du virus sur chaque lot de semence destiné aux échanges.

5. Précautions vis-à-vis de la contamination des milieux de maturation, fécondation et culture

Selon les dernières recommandations de l'IETS, tous les produits d'origine biologique devraient être testés pour la présence du BHV-1, de même que les animaux dont ils sont issus [4].

Le processus de stérilisation du sérum ne doit pas altérer les composants biologiques qui sont à l'origine de ses propriétés. Certains traitements semblent efficaces [4] :

- le traitement physique par gamma-irradiation.
- le traitement chimique par la bêta-propiolactone.
- le traitement thermique à 56°C pendant 30 minutes suivi d'une ultracentrifugation puis de plusieurs filtrations par des pores de 0,1µm.

Le remplacement du sérum par du sérum albumine bovine et la préparation de milieux conditionnés permettraient de réduire les risques sanitaires. Le moyen le plus sûr serait l'emploi de substituts de sérum tels que le polyvinyle alcool, le hyaluronate de sodium ou le surfactant BF-5 [45].

Les cellules issues d'oviducte ou de cumulus prélevées en abattoir sur des animaux au statut sanitaire inconnu et établies en culture primaire présentent un risque important. Elles peuvent être avantageusement remplacées par des lignées établies de cellules somatiques qui peuvent être contrôlées sur le plan sanitaire (lignées MDBK : cellules rénales de bovin, BRL : cellules de foie, Vero : cellules de rein de singe vert) [44]. Une alternative à l'avenir pourra être constituée par l'utilisation de milieux « chimiquement définis » ou « semi-définis », milieux salins relativement simples additionnés d'acides aminés : SOF (Synthetic oviduct fluid), CR1 (milieu de Rosenkrans), BMOC-3 (milieu de Brinster) [44].

6. Contrôle de qualité sanitaire de la manipulation

En France, la production d'embryons *in vitro* et le transfert embryonnaire ne peuvent être effectués que par des équipes de collecte et de transfert officiellement agréés par le Ministère de l'Agriculture (Direction Générale de l'Alimentation). Plusieurs conditions d'agrément sont nécessaires : compétence du personnel (présence obligatoire d'un vétérinaire dans l'équipe), équipement et matériel suffisant, engagement solennel et signé du vétérinaire de l'équipe de suivre un certain nombre de règles d'hygiène dans la procédure utilisée en particulier pour la phase *in vitro* : dix lavages, pas de transfert d'embryon à zone pellucide non intact.

Le respect des règles de bonnes pratiques est ensuite assuré par un contrôle *a posteriori* réalisé au moins une fois par an reposant sur un échantillonnage de divers prélèvements issus de ces manipulations. Ce contrôle de qualité sanitaire conditionne la reconduction de l'agrément. Celui-ci est réalisé par le Laboratoire de Contrôle des Reproducteurs (Maisons-Alfort). Les examens réalisés comprennent un dénombrement bactérien, la recherche de mycoplasmes et de virus (BHV-1 et BVD) à partir de différents prélèvements : liquides de collecte, liquides de lavages et embryons non fécondés ou dégénérés pour les collectes d'embryons obtenus *in vivo* ; milieux de maturation, de fécondation *in vitro*, de culture des embryons ainsi que les ovocytes et les embryons

dégénérés pour les embryons obtenus *in vitro*. Pour les embryons susceptibles de sortir de l'élevage, les équipes de collecte conservent après chaque collecte : 1cc du liquide de collecte, 1cc du mélange des trois derniers liquides de lavage (sur les dix obligatoires) et les embryons non fécondés ou dégénérés recueillis. Ceci est envoyé au Laboratoire de Contrôle des Reproducteurs qui tire au sort 5 échantillons à analyser pour les petites équipes ou 10% des prélèvements pour les plus grandes. Il n'existe pas de méthode pour tester directement les embryons avant leur transfert qui n'implique pas leur destruction. La zone pellucide des embryons dégénérés conserve les propriétés d'adhérence aux particules virales malgré les changements morphologiques qu'elle subit, ce qui en fait un bon témoin de contamination des embryons transplantables [84]. Cette méthode de contrôle n'a pas la faveur de tous les auteurs, certains la trouvant trop complexe par rapport au simple contrôle des donneurs de gamètes [96].

Pour le cas de la fécondation *in vitro*, des expériences ont montré que le virus peut ne pas être retrouvé sur les ovocytes et sur les embryons prélevés sur des vaches dont les ovaires, les corps jaunes, les liquides folliculaires et les cellules de la granulosa ont été trouvés contaminés et sont donc eux-mêmes très probablement contaminés. Ceci peut-être dû à une faible contamination qui rend difficile la détection des particules virales même sur culture cellulaire ou à l'organisation cellulaire du cumulus oophorus qui rend l'ovocyte difficilement accessible au virus au tout début de l'infection du follicule, la contamination ne se produisant qu'au cours de la maturation *in vitro*, à partir des cellules du cumulus contaminées. Pour ces ovocytes, la preuve de leur infection n'a pu être obtenue que par l'isolement viral dans les cellules de l'oviducte utilisées pour leur culture, ou dans les liquides de maturation. Le milieu de maturation des ovocytes et celui de la culture des cellules tubaires au contact desquelles l'embryon se développe *in vitro* constituent donc d'excellents milieux révélateurs de la présence du virus [41].

Si 14% des contrôles réalisés entre 1986 et 1993 se sont avérés positifs, il s'agissait de contamination bactérienne. Aucun virus n'a été retrouvé dans les liquides de collecte ou sur les embryons non fécondés ou dégénérés [109]. Le virus ne semble donc pas être un contaminant fréquent lors de transfert embryonnaire : il est classé par l'IETS en catégorie 1, à savoir « agent de maladie pour lequel le risque de transmission est négligeable à condition que les embryons soient manipulés selon les procédures IETS entre leur collecte et leur transfert » [4, 76].

En France, le traitement à la trypsine n'est pas habituellement effectué lors des lavages des embryons. Stringfellow et al. montrent pourtant l'intérêt de celui-ci car des particules virales peuvent être retrouvées sur des embryons expérimentalement contaminés *in vitro* bien que les derniers liquides de lavage de ceux-ci soient restés stériles [105].

7. Élimination des animaux séropositifs

Cette méthode a été utilisée en Suisse où un plan national d'éradication a été mis en place en 1978. Ce plan comprend :

- Un contrôle sérologique annuel du troupeau national
- L'abattage des animaux séropositifs
- La restriction des échanges de bétail afin de prévenir la transmission de l'infection : les animaux doivent être séronégatifs pour être mis sur le marché, les animaux séropositifs ne peuvent être vendus pour l'élevage mais doivent être abattus. Pour qu'une exploitation puisse réintroduire les animaux sur le marché, deux bilans sérologiques négatifs réalisés à six mois d'intervalle sur tous les animaux sont nécessaires
- Aucun vaccin contre l'IBR n'est autorisé
- Prévention des nouveaux foyers en réglementant l'importation du bétail et du sperme.

En dix ans, la Suisse est devenue virtuellement indemne d'IBR. Cette méthode n'est toutefois possible qu'en partant d'une prévalence basse ce qui était le cas en Suisse (environ 4,2%) [104].

B. Prophylaxie médicale

1. Vaccination

a. Vaccins disponibles

De nombreux vaccins sont disponibles contre le BHV-1. Seuls les vaccins inactivés sont autorisés en France à cause des risques de diffusibilité de la souche vaccinale par mutation lors de la vaccination avec un vaccin vivant atténué [40 ; tableau II]. Les souches atténuées peuvent en effet se multiplier chez l'hôte sans engendrer d'effets pathogènes mais avec le risque de retrouver un phénotype virulent [63]. De plus, l'utilisation de ces vaccins durant l'œstrus peut provoquer une baisse très importante des taux de gestation (cf infra).

Tableau II : Les types de vaccins disponibles en France contre l'IBR (d'après [118])

	Titre en virus avant inactivation	Adjuvant	Voie d'administration	Protocole de vaccination	Fréquence des rappels	Nom déposé
vaccin à base de sous-unités virales	30 µg de glycoprotéines virales	huile	sous-cutanée	2 injections à 14-28 jours d'intervalle	1 ^{er} rappel après 4-6 mois, ensuite rappels annuels	IBEPUR (Merial)
vaccin inactivé	10 ^{7,6} DICC ₅₀	huile	sous-cutanée intramusculaire	2 injections à 1 mois d'intervalle	1 ^{er} rappel après 4-6 mois, ensuite rappels annuels	IFFAVAX IBR (Merial)
vaccin inactivé marqué	10 ⁸ DICC ₅₀	hydroxyde d'aluminium, Quil A	sous-cutanée	2 injections à 3-5 semaines d'intervalle	rappel tous les 6 mois	BAYOVAC IBR (Bayer) RHINOBOVIN (Intervet)

Les vaccins inactivés apportent en revanche une grande sécurité d'emploi, la souche virale étant tuée, une infection latente ne peut s'installer. Ces vaccins n'entraînent aucun trouble de la gestation et la baisse des rendements laitiers est négligeable [16]. De plus, le stimulus engendré par cette vaccination est insuffisant pour induire la réexcrétion de la souche sauvage chez un bovin infecté latent [116].

La dernière génération de vaccins est constituée par les vaccins marqués dont l'intérêt majeur est de pouvoir faire une différenciation sérologique entre les animaux vaccinés et les animaux infectés. Ces vaccins sont constitués d'une souche virale dépourvue d'une protéine d'enveloppe. Actuellement, le seul mutant utilisé porte une délétion sur le gène codant pour la glycoprotéine gE. Les animaux ainsi vaccinés ne produisent donc pas d'anticorps anti gE, à la différence des animaux infectés par le virus sauvage (tableau III). L'obtention de ce mutant se fait par sélection naturelle (souche Zagreb, souche atténuée) ou par génie génétique. Les autres mutants étudiés jusqu'à ce jour ne présentent pas les mêmes qualités d'immunogénicité (délétion gI) ou gardent une virulence trop importante (délétion gC).

Tableau III : Résultat des tests ELISA classiques et associés à un vaccin délété en fonction du statut immunitaire de l'animal

Statut animal Test	Infecté	Vacciné		Indemne
		Vaccin conventionnel	Vaccin porteur d'une délétion (ex : gE)	
Classique (Ac totaux)	+	+	+	-
Associé à vaccin délété (ex. Ac anti-gE)	+	+	-	-

Le dernier type de vaccin actuellement disponible sur le marché est constitué de glycoprotéines virales. Ce vaccin sous-unitaire présente la garantie de ne contenir ni virus infectieux, ni ADN viral. Les recherches se concentrent sur la production de vaccins réalisés à partir d'une ou plusieurs glycoprotéines virales bien précises de manière à permettre là aussi la différenciation sérologique avec les animaux contaminés. Parmi les trois glycoprotéines majeures du BHV-1, seule la glycoprotéine gD semble conférer une bonne protection contre la maladie clinique et réduire de façon importante l'excrétion nasale [63].

Actuellement, les recherches portent sur la fabrication de nouveaux vaccins limitant encore plus la réexcrétion virale (vaccins recombinants utilisant les adénovirus bovins ou humains comme vecteurs de transgènes codant pour les glycoprotéines d'enveloppe du BHV-1) [74], ou permettant une immunité plus durable (transfert direct de DNA plasmidique contenant un gène codant pour une glycoprotéine virale, gD notamment) [24].

b. Efficacité de la vaccination

• Protection clinique

Tous les vaccins actuellement sur le marché sont aptes à conférer une protection clinique efficace durant 6 à 9 mois [131].

Les vaccins sont généralement prévus pour prévenir la forme respiratoire et le niveau de protection qu'ils confèrent contre la forme génitale est inconnu. Une expérience montre d'ailleurs l'inefficacité de la protection apportée par un vaccin sous-unitaire lors d'une insémination avec une paille contaminée par une souche BHV-1 type 1 [103].

Les vaccins vivants et même inactivés semblent conférer une protection efficace contre les avortements [25, 82]. Toutefois, la vaccination est inefficace pour enrayer un épisode d'avortements dus au BHV-1 car la mortalité des embryons a commencé bien avant les premiers avortements [54].

• Protection virologique

Actuellement, les vaccins ne sont plus seulement utilisés pour protéger les bovins contre les maladies induites par le BHV-1 mais aussi pour réduire la circulation virale dans les cheptels, ceci dans un but d'assainissement de ceux-ci.

Les vaccins inactivés, contrairement aux vaccins vivants atténués, sont incapables d'induire une réponse cytotoxique. Ainsi, seule une partie de l'inoculum est neutralisée, les cellules infectées ne sont pas détruites et le virus peut s'installer à l'état latent. L'immunité conférée par les vaccins vivants est donc plus complète. L'induction d'une immunité de type cellulaire permet notamment de limiter la propagation du virus : les particules virales sont neutralisées et les cellules infectées détruites. De plus, lorsqu'ils sont administrés par voie nasale, ces vaccins permettent la synthèse d'IgA au niveau des muqueuses qui empêchent l'installation et la réexcrétion de particules virales.

A ce jour, aucun vaccin ne peut assurer une protection virologique complète. En effet, un animal séronégatif vacciné de manière conventionnelle reste sensible à l'infection par le BHV-1. Lors d'une infection, il n'aura pas de signes cliniques de la maladie, mais excrétera du virus infectieux durant 10 à 14 jours puis deviendra porteur latent. La vaccination limite toutefois l'excrétion virale, y compris dans la semence, ce qui a pu être montré lors d'un épisode naturel d'IBR sub-clinique dans un centre d'insémination artificielle où les taureaux vaccinés ont en moyenne excrété moins de virus que ceux qui n'étaient pas vaccinés [131]. Même l'utilisation de protocoles de vaccination plus intensifs ne suffit pas à prévenir la multiplication virale après une primo-infection ultérieure [60]. Toutefois, la protection totale du bovin séronégatif n'est pas un but prioritaire dans le cadre du contrôle de l'IBR. Les mesures sanitaires et notamment les contrôles sérologiques d'introduction associées à une quarantaine stricte dans l'attente des résultats sont les mesures les plus indiquées (malgré certaines limites, cf infra : animaux faux-négatifs) pour maîtriser le problème de la contamination des cheptels sains en attendant l'arrivée de vaccins plus immunogènes.

Le rôle du vaccin est avant tout d'immuniser les animaux porteurs latents présents dans un troupeau pour éviter la réexcrétion de virus infectieux, point de départ d'une

circulation virale. Une étude de terrain montre des séroconversions moindres dans les élevages effectuant des vaccinations par rapport à d'autres sans vaccination [15]. Pour rendre les vaccins plus immunogènes, il convient de modifier les protocoles de vaccination : soit en augmentant le nombre d'injections, soit en choisissant une meilleure voie d'administration (voie intra-nasale, par exemple), soit en combinant ces deux approches. Des expériences de vaccination intensifiée avec un vaccin sous-unitaire avec rappel tous les six mois montrent l'intérêt de ce protocole qui permet une réduction de la réexcrétion en intensité et en durée [60]. Ces résultats permettent de conclure qu'un protocole de vaccination intensif apporte une aide indéniable au contrôle de l'IBR, mais ne peut garantir un arrêt complet de l'excrétion et de la réexcrétion virale chez les bovins subissant une réinfection ou un épisode de réactivation.

• Plan de lutte

Les vaccins délétés ayant prouvé leur efficacité par rapport aux vaccins conventionnels, ils peuvent être utilisés dans un plan de lutte en milieu contaminé afin de différencier vaccination et infection. Ceci est aussi possible car la durée de vie des anticorps anti gE après infection par un virus sauvage est d'au moins deux ou trois ans, un bovin infecté sera donc longtemps détectable [63]. La seule réserve vient de la sensibilité inférieure du test ELISA anti gE par rapport à la séroneutralisation qui reste le test de référence. Des animaux réellement infectés et porteurs d'anticorps anti-gE à bas titre pourraient ainsi ne pas être dépistés (faux-négatifs), et représenter un danger épidémiologique évident. Ce danger, à lui seul, justifie l'introduction dans les centres d'insémination artificielle des seuls taureaux dont la séronégativité est vérifiée par séroneutralisation ou par un test ELISA-Anticorps totaux.

L'utilisation d'un vaccin marqué inactivé de manière systématique a prouvé lors d'une expérience terrain portant sur 16000 animaux une réduction très nette de la circulation virale [15].

Le protocole de vaccination présenté dans le tableau IV correspond à un protocole en cheptel fortement infecté. En cas de cheptel peu infecté, avec des animaux séropositifs plutôt âgés, une vaccination des seuls animaux séropositifs tous les six mois peut être suffisant en attendant leur réforme et avec des sérologies régulières pour vérifier l'absence de circulation virale. Il est dangereux d'arrêter brutalement une vaccination contre l'IBR car il est impossible de prévoir la fréquence des accès de réactivation et de circulation du BHV-1 [29].

Ces plans doivent s'accompagner de mesures sanitaires rigoureuses : la réforme la plus précoce possible des animaux séropositifs et une quarantaine stricte associée à un contrôle sérologique lors de la visite d'achat.

Tableau IV : Protocole de vaccination à appliquer dans le cadre d'un plan de lutte contre l'IBR

PREMIERE PHASE

Veaux âgés de moins de m

L'addition de gamma-globulines provenant de sérum hyperimmunisé inactive les particules virales contenues dans le sperme [90]. Cette méthode pourra peut-être connaître un intérêt dans l'avenir avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux.

Une alternative semble être l'utilisation de jaune d'œuf hyper-immunisé pour neutraliser les particules virales. Le jaune d'œuf est habituellement utilisé comme diluant et cryoprotecteur des cellules spermatiques durant le processus de congélation. La vaccination de poules permet l'obtention de jaunes d'œuf hyper-immunisés qui peuvent neutraliser les particules virales jusqu'à une concentration de 5.10^4 DICT₅₀/ml sans avoir d'effets délétères sur les cellules spermatiques après congélation/décongélation. L'avenir de cette méthode passe par une réponse immunitaire supérieure et d'une plus grande régularité entre les poules vaccinées [93].

L'action d'agents photosensibilisants (hématoporphyrine et dérivés, thiopyronine) semble avoir une grande efficacité pour détruire les particules virales de BHV-1 présentes dans de la semence expérimentalement contaminée. Mais l'action de la thiopyronine fait baisser le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, et l'ensemble de ces agents diminue le pourcentage de spermatozoïdes à acrosome intact que ce soit avant ou après congélation par rapport aux lots témoins. Malgré cela, les échantillons traités restent dans des normes compatibles avec une utilisation pour l'insémination artificielle [33].

En plus de compenser les carences des tests de détection classique, ces méthodes d'inactivation pourraient dans certains cas permettre l'utilisation de la semence de taureaux séropositifs, mais possédant une grande valeur génétique.

3. Traitement des embryons

La législation française impose « le lavage des embryons (qu'ils soient obtenus *in vivo* ou *in vitro*) au minimum 10 fois successivement avec un taux minimal de dilution de 1% par lavage et un examen microscopique après le dernier bain de lavage de chaque embryon avec un grossissement de 50 fois sur toute sa surface afin de contrôler l'intégrité de la zone pellucide et d'en éliminer toute matière adhérente » (arrêté du 13 Juillet 1994). La loi française n'impose donc pas de lavage à la trypsine, qui est pourtant prévu dans les recommandations de l'IETS qui ne considère toutefois pas la trypsine comme un désinfectant général mais comme un produit qui doit être utilisé dans le cadre de la lutte contre certains organismes pathogènes bien précis et notamment le BHV-1.

Si le traitement à la trypsine semble garantir une très bonne efficacité sur des embryons produits *in vivo*, même fortement contaminés tout en préservant la viabilité embryonnaire [105], il ne semble pas en aller de même avec les embryons issus de la fécondation *in vitro*.

Une expérience d'exposition virale *in vitro* d'embryons de 6-8 jours pendant 18-24 heures montre l'insuffisance de 5 lavages successifs : des particules virales sont retrouvées sur la zone pellucide de 50% des embryons mis en contact avec une suspension virale et 80% de ceux mis en contact avec une culture cellulaire contaminée. On ne sait pas en revanche si le virus est uniquement adsorbé à la zone pellucide ou si il pénètre celle-ci et infecte les cellules embryonnaires [38]. Ce traitement comprend toutefois un nombre insuffisant de lavages par rapport aux normes de l'IETS.

Le traitement à la trypsine ne semble pas pouvoir être applicable aux ovocytes, dont le site de reconnaissance du spermatozoïde (antigène ZP3) situé sur la zone pellucide pourrait être dénaturé par l'action de certaines enzymes protéolytiques empêchant ainsi leur fécondation ultérieure [41]. Ceci pose un véritable problème car les expériences s'accordent pour montrer l'insuffisance de 10 lavages pour éliminer les particules virales d'embryons issus d'ovocytes contaminés *in vitro* ou *in vivo* puis fécondés *in vitro* [9, 11, 41, 42]. De plus, la trypsine appliquée sur des ovocytes ou sur des embryons de 7 jours fécondés *in vitro* et expérimentalement contaminés ne permet pas une élimination totale des particules virales sur tous les embryons. L'échec du traitement sur ce type d'embryon alors qu'il se montre très efficace sur les embryons produits *in vivo* n'est pas encore connu. Il peut être dû aux changements physico-chimiques de la zone pellucide causés par les conditions de culture *in vitro* qui empêcheraient l'action de la trypsine ou à la pénétration et à la réplication virale à l'intérieur même de la cellule embryonnaire [42]. Le BHV-1 est en effet capable de se répliquer dans les embryons fécondés *in vitro* dépellucidés [132]. Les dernières hypothèses font plutôt état d'un piégeage viral à l'intérieur de la zone pellucide dû au remaniement important de celle-ci pendant le développement embryonnaire (cf supra) [134]. La trypsine ne semble toutefois pas avoir d'effets délétères sur le développement ultérieur jusqu'au stade blastocyste [12, 75].

Une alternative à la trypsine semble être l'utilisation d'agents photosensibilisants (hématoporphyrine et dérivés) suivie d'un éclairage des embryons. Cette méthode semble très efficace sur le plan sanitaire sans produire d'effets délétères sur le développement *in vitro* mais des doutes persistent quant à la viabilité des embryons après leur transfert [8]. La marge entre l'effet antimicrobien de ces agents et l'effet embryocide est encore trop faible pour en faire des désinfectants de routine [4].

CONCLUSION

Les problèmes cliniques posés par le BHV-1 dans les élevages sont essentiellement dus à ce jour à la forme respiratoire. La lutte est rendue difficile par la latence virale, un animal atteint étant porteur viral toute sa vie. L'assainissement passe donc obligatoirement par son élimination à terme, d'où un problème en milieu à forte prévalence. De plus, aucun vaccin n'assure de protection virologique totale jusqu'à ce jour, mais uniquement une protection clinique. Aucun plan de lutte ne peut donc garantir à coup sûr l'assainissement en un temps donné.

Toutefois, les besoins des éleveurs sont très différents vis-à-vis du BHV-1. Bien qu'il existe des foyers cliniques graves d'IBR, le nombre de cas cliniques est actuellement réduit et le coût économique direct du BHV-1 est ainsi collectivement faible. Si un plan de lutte global serait sans aucun doute le plus efficace pour éradiquer le virus, il ne se justifierait pas économiquement pour un grand nombre d'élevages, d'où la politique actuelle de certification qui passe par une démarche volontaire.

La transmission entre élevages, outre l'achat de bovins contaminés (voie de contamination principale) peut également se faire par l'intermédiaire de la semence ou des embryons. Dans le cadre de la certification actuelle d'élevage indemne d'IBR, cela nécessite une maîtrise sanitaire des nouvelles techniques de reproduction assistée, tant au niveau des animaux sources que du matériel biologique obtenu à partir de ceux-ci et des conditions de sa manipulation. Cela justifie le fait que les seules réglementations touchant le BHV-1 concernent l'insémination artificielle et le transfert embryonnaire.

Néanmoins la mise en place de plans de lutte et de prophylaxie maîtrisant toutes les voies de transmission devient capitale, l'IBR étant actuellement au centre d'enjeux économiques importants à l'échelle du pays : les Etats membres de l'Union européenne officiellement indemnes d'IBR peuvent se prévaloir de garanties additionnelles pour l'importation du bétail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ACKERMANN (M.), PETERHANS (E.), WYLER (R.).- DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1982, **43**, 36-41.
- [2] ACKERMANN (M.), WYLER (R.).- The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.*, 1984, **9**, 53-63.
- [3] ALVES (D.).- Trends in bovine abortions submitted to the Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. *Can. Vet. J.*, 1996, **37**, 287-288.
- [4] Anonymous. Manual of the I.E.T.S (International Embryo Transfer Society), 1998, D.A. Stringfellow, 3ème édition, Savoy, Illinois, S.M. Seidel Eds., Champaign, Illinois, 170 pages.
- [5] AVERY (B.), GREVE (T.), RONSHOLT (L.), BOTNER (A.).- Virus screening of a bovine in vitro embryo production system. *Vet. Rec.*, 1993, **132**, 660.
- [6] BIELANSKI (A.), SINGH (L.), HARE (W.C.D.).- The *in vitro* exposure to bovine rhinotracheitis virus of zona pellucida-micromanipulated bovine embryos with the zona pellucida damaged or removed. *Theriogenology*, 1987, **28**, 495-501.
- [7] BIELANSKY (A.), LOEWEN (K.G.), HARE (W.C.D.).- Inactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) from *in vitro* infected bovine semen. *Theriogenology*, 1988, **30**, 649-657.
- [8] BIELANSKY (A.), DUBUC (C.), HARE (W.C.D.), MYERS (D.J.), EAGLESOME (M.D.).- Inactivation of bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in association with preimplantation bovine embryos using photosensitive agents. *Theriogenology*, 1992, **38**, 633-644.
- [9] BIELANSKY (A.), DUBUC (C.).- In vitro fertilization of bovine oocytes exposed to bovine herpesvirus 1 (BHV-1).- *Reprod. Dom. Anim.*, 1993, **28**, 285-288.
- [10] BIELANSKY (A.), LOEWEN (K.S.), DEL CAMPO (M.R.), SIRARD (M.A.), WILLADSEN (S.).- Isolation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) in association with the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 1993, **40**, 531-538.
- [11] BIELANSKY (A.), DUBUC (C.).- In vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). *Theriogenology*, 1994, **41**, 1211-1217.
- [12] BIELANSKI (A.), LUTZE-WALLACE (C.), SAPP (T.), JORDAN (L.).- The efficacy of trypsin for disinfection of in vitro fertilized bovine embryos exposed to bovine herpes virus 1. *Anim. Reprod. Sci.*, 1997, **47**, 1-8.
- [13] BITSCH (V.).- IBR virus infection in bulls, with special reference to preputial infection. *Appl. Microbiol.*, 1973, **26**, 337-343.

- [14] BOECKX (M.), IBRAHIM (M.), BOUTERS (R.).- De invloed van een acute IPV/IBR infectie op de bevruchtingsresultaten van K.I. stieren. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr.*, 1968, **37**, 177-188.
- [15] BOSCH (J.C.), FRANKENA (K.), FRANKEN (P.).- Bovine herpesvirus 1 marker vaccines reduce the incidence of infections. Proc. Symposium on IBR and other ruminant herpesvirus infections. Liège, Belgique, 26-27 July 1995.
- [16] BOSCH (J.C.), FRANKENA (K.), VAN OIRSCHOT (J.T.).- Effect on milk production of vaccination with a bovine herpesvirus 1 gene-deleted vaccine. *Vet. Rec.*, 1997, **140**, 196-199.
- [17] BOWEN (A.), ELSDEN (R.P.), SEIDEL (G.E.).- Infection of early bovine embryos with bovine herpesvirus-1. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 1095-1097.
- [18] CASTRO (R.S.), LEITE (R.C.), ABREU (J.J.), COEHLO (S.G.), FREITAS (C.).- Reproductive performance of serum positive bovine embryo donors naturally infected by BHV1 and/or BVD viruses. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 1991, **15**, 191-198.
- [19] CASTRO (R.S.), LEITE (R.C.), ABREU (J.J.), LAGE (A.P.), FERRAZ (I.B.), LOBATO (Z.I.P.), BALSAMAO (S.L.E.).- Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, 1992, **24**, 173-176.
- [20] CHAPMAN (M.S.), LUCAS (M.H.), HEBERT (C.N.), GOODEY (R.G.).- Survival of infectious bovine rhinotracheitis virus in stored bovine semen. *Vet. Sci. Commun.* 1979, **3**, 137-139.
- [21] CHIANG (B.C.), SMITH (P.C.), NUSBAUM (K.E.), STRINGFELLOW (D.A.).- The effect of infectious bovine rhinotracheitis vaccine on reproductive efficiency in cattle vaccinated during estrus. *Theriogenology*, 1990, **33**, 1113-1120.
- [22] CHOW (T.L.), MOLELLO (J.A.), OWEN (N.V.).- Abortion experimentally induced in cattle by infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1964, **144**, 1005-1007.
- [23] CONRADI (H.), HUBRIG (T.), WOHANKA (K.).- Untersuchungen und Beobachtungen zum Blaeschenausschlag des Rindes. *Berl. Muench. tierärztl. Wschr.*, 1960, **73**, 46-52.
- [24] COX (G.J.M.), ZAMB (T.J.), BABIUK (L.A.).- Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J. Virol.*, 1993, **67**, 5664-5667.
- [25] CRAVENS (R.L.), ELLSWORTH (M.A.), SORENSEN (C.D.), WHITE (A.K.).- Efficacy of a temperature-sensitive modified-live bovine herpesvirus type-1 vaccine against abortion and stillbirth in pregnant heifers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, **208**, 2031-2034.
- [26] DEAS (D.W.), JOHNSTON (W.S.).- The isolation and transmission of the virus of IBR/IPV. *Vet. Rec.*, 1973, **92**, 636-639.

- [27] DENIS (M.), SPLITTER (G.), THIRY (E.), PASTORET (P.P.), BABIUK (L.A.).- Infectious bovine rhinotracheitis (Bovine Herpesvirus 1): helper T cells, cytotoxic T cells and NK cells. 1994, 10, 157-172.
- [28] DENNETT (D.P.), BARASA (J.O.), JOHNSON (R.H.).- Infectious bovine rhinotracheitis virus: studies on the venereal carrier status in range cattle. *Res. Vet. Sci.*, 1976, **20**, 77-83.
- [29] DE WERGIFOSSE (B.), LEMAIRE (M.), PASTORET (P.P.).- Etablissement d'un plan volontaire de contrôle de la rhinotrachéite infectieuse bovine en région wallonne de Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1997, **141**, 185-196.
- [30] DREW (T.W.), HEWITT-TAYLOR (C.), WATSON (L.), EDWARDS (S.).- Effect of storage conditions and culture technique on the isolation of IBR virus from bovine semen. *Vet. Rec.*, 1987, **121**, 547-548.
- [31] DUCLOS (P.).- Cahier des charges techniques du système national d'appellation de cheptel en matière de rhinotrachéite infectieuse bovine. *Proceeding des Journées Nationales des GTV*, Vichy 21-23 Mai 1997, 303-311.
- [32] DUFOUR (B.).- La commission scientifique fait le point sur l'IBR. *GDS-info*, 1990, **100**, 15-23.
- [33] EAGLESOME (M.D.), BIELANSKI (A.), HARE (W.C.D.), RUHNKE (H.L.).- Studies on inactivation of pathogenic micro organisms in culture media and in bovine semen by photosensitive agents. *Vet. Microbiol.*, 1994, **38**, 277-284.
- [34] EDWARD (S.), WHITE (H.), NIXON (P.).- A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the U.K.- *Vet. Microbiol.*, 1990, **22**, 213-223.
- [35] EDWARDS (S.), NEWMAN (R.H.), WHITE (H.).- The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. *Br. Vet. J.*, 1991, **147**, 216-231.
- [36] ELAZHARY (M.A.S.Y.), LAMOTHE (P.), SILIM (A.), ROY (A.S.).- Bovine herpesvirus type 1 in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. *Can. Vet. J.*, 1980, **21**, 336-339.
- [37] FRANKEMA (K.), FRANKEN (P.), VANDEHOEK (J.), KOSKAMP (P.), KRAMPS (J.A.).- Probability of detecting antibodies to bovine herpes virus 1 in bulk milk after the introduction of a positive animal on to a negative farm. *Vet. Rec.*, 1997, **140**, 90-92.
- [38] GILLESPIE (J.H.), SCHLAFER (D.H.), FOOTE (R.H.), QUICK (S.), DOUGHERTY (E.), SCHIFF (E.), ALLEN (S.).- Comparison of persistence of seven bovine viruses on bovine embryos following in vitro exposure. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 1990, **97**, 65-68.
- [39] GOFFAUX (M.), HARLAY (T.), ALLIETTA (M.).- Untersuchungen ueber das IBR-IPV-Virus im Samen von Besamungsbullen. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 1976, **83**, 544-547.

- [40] GREGERSEN (J.P.), WAGNER (K.).- Persistent infection of the genital tract and excretion of the vaccine strain after live virus immunization with bovine herpesvirus 1 (IBR/IPV virus). *Zbl. Vet. Med.*, 1985, **32**, 354-360.
- [41] GUERIN (B.), LE GUIENNE (B.), CHAFFAUX (St.), HARLAY (T.), ALLIETTA (M.), THIBIER (M.).- Contamination des ovocytes et des embryons fécondés in vitro après infection expérimentale de vaches donneuses par le virus herpes bovin de type 1 (BHV1). *Rec. Méd. Vét.*, 1989, **165**, 827-833
- [42] GUERIN (B.), MARQUANT-LE GUIENNE (B.), ALLIETTA (M.), HARLAY (T.), THIBIER (M.).- Effets de la contamination par le BHV1 sur la maturation et la fécondation in vitro des ovocytes de bovins. *Rec. Méd. Vét.*, 1990, **166**, 911-917.
- [43] GUERIN (C.), HARLAY (T.), GUERIN (B.), THIBIER (M.).- Distribution of BHV1 in fractions of semen from a naturally infected bull. *Theriogenology*, 1993, **40**, 997-1002.
- [44] GUERIN (B.), GUYADER-JOLY (C.), MERMILLOD (P.), LEGUIENNE (B.).- La production in vitro et la cryoconservation de l'embryon chez les bovins. *Point Vét.*, 1996, **28**, 857-871.
- [45] GUERIN (B.), NIBART (M.), MARQUANT-LE GUIENNE (B.), HUMBLLOT (P.).- Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology*, 1997, **47**, 33-42.
- [46] GUILLIAM (S.E.), THACKRAY (A.M.), BROWN (G.A.), FIELD (H.J.).- The pathogenesis of wild type and drug resistant mutant strains of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in the natural host. *Arch. Virol.* 1993, **128**, 43-54.
- [47] GUEVARA (M.P.).- Survival of IBR/IPV virus in bull semen frozen in pellet form, and its possible dissemination during storage. *Ciencias Veterinarias*, Costa Rica, 1979, **1**, 25-30, Cited from *Vet. Bull.* 1980, **50**, 772-nr.5650.
- [48] HAGE (J.J.), SCHUKKEN (Y.H.), BARKEMA (H.W.), BENEDICTUS (G.), RIJSEWIJK (F.A.M.), WENTINK (G.H.).- Population dynamics of bovine herpesvirus 1 infection in a dairy herd. *Vet. Microbiol.*, 1996, **53**, 169-180.
- [49] HAGE (J.J.), VELLEMA (P.), SCHUKKEN (Y.H.).- Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus 1 transmission. *Vet. Microbiol.*, 1997.
- [50] HUCK (R.A.), MILLAR (P.G.), EVANS (D.H.), STABLES (J.W.), ROSS (A.).- Penoposthitis associated with IBR/IPV virus in a stud of bulls. *Vet. Rec.*, 1971, **88**, 292-297.
- [51] KAHRS (R.F.).- Effects of Infectious Bovine Rhinotracheitis on reproduction. *Theriogenology*, 1986, **2**, 250-254.
- [52] KENDRICK (J.W), STRAUB (O.C.).- Infectious Bovine Rhinotracheitis-Infectious Pustular Vulvovaginitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, 1967, **28**, 1269-1282.
- [53] KENDRICK (J.W).- Effect of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the fetus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1973, **163**, 852-854.

- [54] KIRKBRIDE (C.A.).- Etiologic agents detected in a 10-years study of bovine abortions and stillbirths. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1992, **4**, 175-180.
- [55] KNOBLAUCH (H.).- Der Virus-Blaeschenausschlag des Rindes als Massenerkrankung auf einer Besamungsstation. *Mh. Vet. Med.*, 1962, **11**, 445-450.
- [56] KÖHLER (H.), KUBIN (G.).- Zur Virologie, Serologie und Pathomorphologie des männlichen Genitale nach natürlicher und experimenteller Infektion mit dem IBR-IPV-Virus, *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 1972, **79**, 121-124, 209-214.
- [57] KRPTA (V.).- Spread of IBR-IPV virus from contaminated to uncontaminated pellets of frozen bull semen. *Sbornik Vedckych Praci Ustredniho Statniho Veterinarniho Ustavu*, 1982, **12**, 53-58, Cited *Vet. Bull.* 1983, **53**, 469-nr.3149.
- [58] KUPFERSCHMIED (H.U.), KIHM (U.), BACHMANN (P.), MULLER (K.H.), ACKERMANN (M.).- Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. *Theriogenology*, 1986, **25**, 439-443.
- [59] LEMAIRE (M.), PASTORET (P.P.), THIRY (E.).- Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 1994, **138**, 167-180.
- [60] LEMAIRE (M.), THIRY (E.).- Virological protection attempted by repeated vaccinations with inactivated vaccines directed against bovine herpesvirus 1 infection. Résumé, Symposium on IBR and other ruminant herpesvirus infections. Sart Tilman, Belgique, 26-27 Juillet 1995.
- [61] LEMAIRE (M.), MEYER (G.), ERNST (E.).- Latent bovine herpesvirus 1 infection in calves protected by colostral immunity. *Vet. Rec.*, 1995, **137**, 70-71.
- [62] LEMAIRE (M.), DE WERGIFOSSE (B.), NOLS (L.).- A study of the seroprévalence of bovine herpesvirus 1 infection in the Walloon region of Belgium. *VIIIth International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, Paris, France, 8-11 Juillet 1997.
- [63] LE TALLEC (B.), GUERIN (B.).- 360° sur...l'IBR : Les vaccins contre la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Bull. GTV*, 2000, **6**, 61-64.
- [64] MARE (C.J.), VAN RENSBURG (S.J.).- The isolation of viruses associated with infertility in cattle: a preliminary report. *J. South Afr. Vet. Med. Ass.* 1961, **32**, 201-210.
- [65] MENARD (M.F.).- Les moyens de diagnostic de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) au laboratoire. *Journées nationales des GTV*, Vichy, 21-23 Mai 1997, 291-296.
- [66] METZLER (A.E.), MATILE (H.), GASSMANN (U.), ENGELS (M.), WYLER (R.).- European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.*, 1985, **85**, 57-69.
- [67] MEYER (G.), D'OFFAY (J.), THIRY (E.).- Les encéphalites à herpesvirus bovins. *Point Vét.*, 2000, **209**, 49-56.

- [68] MILLER (J.M.), VAN DER MAATEN (M.J.).- Early embryonic death in heifers after inoculation with bovine herpesvirus-1 and reactivation of latent virus in reproductive tissue. *Am. J. Vet. Res.*, 1984, **45**, 790-794.
- [69] MILLER (J.M.), VAN DER MAATEN (M.J.).- Effect of primary and recurrent infectious bovine rhinotracheitis virus infection on the bovine ovary. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 1434-1437.
- [70] MILLER (J.M.), VAN DER MAATEN (M.J.).- Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effects on the bovine corpus luteum and conceptus. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 223-228.
- [71] MILLER (J.M.), VAN DER MAATEN (M.J.).- Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, 1987, **48**, 1555-1558.
- [72] MILLER (J.M.), WHETSTONE (C.A.), VAN DER MAATEN (M.J.).- Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 458-461.
- [73] MISRA (P.K.), MISHRA (A.).- Infectious bovine rhinotracheitis infection and infertility in cows, heifers and bulls. *Indian J. Anim. Sci.*, 1987, **57**, 267-271.
- [74] MITTAL (S.K.), PAPP (Z.S.), TIKOO (S.K.).- Induction of systemic and mucosal immune response in cotton rats immunized with human adenovirus type 5 recombinants expressing the full and truncated forms of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gD. *Virology*, 1996, **222**, 299-309.
- [75] MÖDL (J.), PALMA (G.A.), BREM (G.).- Exposure of in vitro produced embryos to trypsin does not decrease embryonic development. *Theriogenology*, 1996, **45**, 222.
- [76] MURRAY (R.D.).- A field investigation of causes of abortion in dairy cattle. *Vet. Rec.*, 1990, **127**, 543-547.
- [77] O.I.E. Conclusions of the research subcommittee of the International Embryo Transfert Society (IETS) Import/Export Committee. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1992, **11**, 937-938.
- [78] OWEN (N.V.), CHOW (T.L.), MOLELLO (J.A.).- Infectious Bovine Rhinotracheitis : Correlation of fetal and placental lesions with viral isolations. *Am. J. Vet. Res.*, 1968, **29**, 1959-1965.
- [79] OWEN (N.V.), CHOW (T.L.), MOLELLO (J.A.).- Infectious Bovine Rhinotracheitis : relationship of level of maternal antibody titer to incidence of fetal death and abortion. *Am. J. Vet. Res.*, 1968, **29**, 1967-1970.
- [80] PASTORET (P.-P.), BABIUK (L.A.), MISRA (V.), GRIEBEL (P.).- Reactivation of temperature-sensitive and non-temperature-sensitive infectious bovine rhinotracheitis vaccine virus with dexamethasone. *Inf. Immun.*, 1980, **29**, 483-488.

- [81] PASTORET (P.-P.), THIRY (E.), DUBUISSON (J.). - La rhinotrachéite infectieuse bovine : pathogénie, épidémiologie et prophylaxie. In: *Maladies respiratoires des jeunes bovins: Où en est on? Où va-t'on ? Société française de buïatrie*, 1988, 67-74.
- [82] POSPISIL (Z.), KREJCI (J.), MACHATKOVA (M.), ZENDULKOVA (D.), LANY (P.), CIHAL (P.).- The efficacy of an inactivated IBR vaccine in the prevention of intra-uterine infection and its use in a disease-control programme. *J. Vet. Med.*, 1996, **43**, 15-21.
- [83] PRITCHARD (G.), COOK (N.), BANKS (M.).- Infectious Pustular Vulvovaginitis / infectious Pustular balanoposthitis in cattle. *Vet. Rec.*, 1997, **31**, 587.
- [84] RIDELL (K.P.), STRINGFELLOW (D.A.), GRAY (B.W.), RIDELL (M.G.), WRIGHT (J.C.), GALIK (P.K.).- Structural and viral association comparisons of bovine zonae pellucidae from follicular oocytes, day-7 embryos and day-7 degenerated ova. *Theriogenology*, 1993, **40**, 1281-1291.
- [85] ROCHA (M.A.), BARBOSA (E.F.), GUIMARAES (S.E.F.), DIAS NETO (E.), GOUVEIA (A.M.G.).- A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet. Microbiol.*, 1998, **63**, 1-11.
- [86] ROCK (D.), LOKENSGARD (J.), LEWIS (T.), KUTISH (G.).- Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 1992, **66**, 2484-2490.
- [87] SCHLAFFER (D.H.). - Experimental transmission of bovine viral diseases by insemination with contaminated semen or during embryo transfer. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 1990, **97**, 68-72.
- [88] SCHULTZ (R.D.), HALL (C.E.), SHEFFY (B.E.), KAHRS (R.F.), BEAN (B.H.).- Current status of IBR/IPV infection in bulls. In: *Proc.80th Ann. Meeting, US Animal Health Association* 1976, 159-168.
- [89] SCHULTZ (R.D.), ADAMS (L.S.), LETCHWORTH (G.), SHEFFY (B.E.), MANNING (T.), BEAN (B.).- A method to test large numbers of bovine semen samples for viral contamination and results of a study using this method. *Theriogenology*, 1982, **17**, 115-123.
- [90] SCHULTZ (R.D.), KAPROTH (M.), BEAN (B.).- Immunoextension: a method to eliminate viral infectivity in contaminated semen. *Proc. Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insemin.*, 1988, **11**, 522.
- [91] SHEFFY (D.E.), DAVIES (D.H.).- Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1972, **140**, 974-976.
- [92] SILVA (N.), SOLANA (A.), CASTRO (J.M.).- Evaluation of the effects of different trypsin treatments on semen quality after BHV-1 inactivation, and a comparison of the results before and after freezing, assessed by a computer image analyzer. *Anim. Reprod.*, 1999, **54**, 227-235.
- [93] SILVA (N.), SOLANA (A.), CASTRO (J.M.).- Inactivation of bovine herpesvirus 1 in semen using a hyperimmune egg yolk semen extender. *J. Vet. Med.*, 2000, **46**, 69-75.

- [94] SINGH (E.L.), THOMAS (F.C.), PAPP-VID (M.D.), EAGLESOME (M.D.).- Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. II. The *in vitro* exposure of preimplantation bovine embryos to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Theriogenology*, 1982, **18**,133-140.
- [95] SINGH (E.L.), HARE (W.C.D.), THOMAS (F.C.), BIELANSKI (A.).- Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IV. Non-transmission of infectious bovine rhinotracheitis / infectious pustular vulvovaginitis virus from donors shedding virus. *Theriogenology*, 1983, **20**, 169-176.
- [96] SINGH (E.L.).- Determining the disease transmission potential of embryo and semen. *Proceedings of 3rd world congress on sheep and beef cattle breeding, 19-23 June 1988, Paris*, 659-672.
- [97] SOURBE (O.), LYAZRHI (F.), SCHELCHER (F.), BERTHELOT (X.), COUPET (H.), HENNEQUIN (M.), JACOB (H.), PICARD-HAGEN (H.).- Effet du test à la dexaméthasone sur la qualité de semence de taureaux Aubrac. *Elev. Insémin.*, 2000, **296**, 3-15.
- [98] SMITH (P.C.).- Necrotic oophoritis in heifers vaccinated intravenously with infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine during estrus. *Am. J. Vet. Med.*, 1990, **51**, 969-972.
- [99] SMITH (P.C.).- Herpesviral abortion in domestic animals. *Vet. J.*, 1997, **153**, 253-268.
- [100] SNOWDON (W.A.).- The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust. Vet. J.*, 1965, **41**, 135-142.
- [101] STRAUB (O.C.).- Untersuchungen zur Bestimmung der Rinderinfektiösen Dosis bei einem virulenten und einem avirulenten BHV1-Stamm zur Ermittlung der Viruslatenz. *Tierärztl. Umsch.*, 1987, **42**, 231-234.
- [102] STRAUB (O.C.).- Infectious bovine rhinotracheitis virus.- *In : Virus infections of vertebrates, Horzinek M.C.(Series Ed), Vol.3: Virus infections of ruminants, Dinter Z., Morein B.(Eds), Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam*, 1990, 71-108.
- [103] STRAUB (O.C.), FUNK (K.), BRUCHHOF (B.).- Challenge infection with IPV virus after inoculation of a bovine herpesvirus 1 subunit vaccine into cattle. *Tierärztl. Umsch.*, 1990, **45**, 383-388.
- [104] STRAUB (O.C.).- BHV-1 infections: relevance and spread in Europe. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.*, 1991, **14**, 175-186.
- [105] STRINGFELLOW (D.A.), LAUERMAN (L.H.), NASTI (K.B.), GALIK (P.K.).- Trypsin treatment of bovine embryos after in vitro exposure to infectious bovine rhinotracheitis virus or bovine herpesvirus-4. *Theriogenology*, 1990, **34**, 427-434.
- [106] STUDDERT (M.J.), BARKER (C.A.V.), SAVAN (M.).- IPV virus infection of bulls. *Am. J. Vet. Res.*, 1964, **25**, 303-314.

- [107] TAINTURIER (D.), FIENI (F.), BRUYAS (J-F.), BATTUT (I).- Etiologie des avortements chez la vache. *Point Vét.*, 1997, **28**, 183.
- [108] THIBIER (M.), NIBART (M.).- Disease control and embryo importations. *Theriogenology*, 1987, **27**, 37-47.
- [109] THIBIER (M.), GUERIN (B.).- Le contrôle de qualité sanitaire du transfert d'embryons bovins : six années d'expérience française. *Bull. Acad. Vét. de France*, 1993, **66**, 429-438.
- [110] THIRY (E.), DETILLEUX (P.H.), DE VRIESE (A.).- La rhinotrachéite infectieuse bovine en période néonatale : revue et exposé d'un cas. *Ann. Med. Vét.*, 1984, **128**, 33-40.
- [111] THIRY (E.), BROCHIER (B.), SALIKI (J.).- Excretion and reexcretion of thermosensitive and wild-type strains of infectious bovine rhinotracheitis virus after co-infection or two successive infections.- *Vet. Microbiol.*, 1985, **10**, 371-380.
- [112] THIRY (E.), SALIKI (J.), SCHWERS (A.).- Parturition as a stimulus of IBR virus reactivation. *Vet. Rec.*, 1985, **116**, 599-600.
- [113] THIRY (E.), DUBUISSON (J.), PASTORET (P.-P.).- Pathogenesis, latency and reactivation of infections by herpesvirus. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1986, **5**, 209-222.
- [114] THIRY (E.), SALIKI (J.), BUBLLOT (M.).- Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 1987, **10**, 59-63.
- [115] THIRY (E.), WELLEMANS (G.), LIMBOURG (B.), BROES (A.), PASTORET (P.-P.).- Effect of repeated intradermal injections of bovine herpesvirus type 1 antigen on seronegative cattle. *Vet. Rec.*, 1992, **130**, 372-375.
- [116] THIRY (E.), LEMAIRE (M.).- Vaccination with BHV-1 inactivated vaccine cannot be considered as a stimulus of reactivation. *19th World Buiatrics Congress, Edinburgh, United Kingdom*, 8-12 July 1996.
- [117] THIRY (E.), LEMAIRE (M.), SCHYNTS (F.), VANDERHEIJDEN (N.), MEYER (G.), EISPAS (M.), PASTORET (P.P.).- La rhinotrachéite infectieuse bovine: l'infection, ses manifestations. *Proceeding des Journées Nationales des GTV*, Vichy, 21-23 Mai 1997, 279-284.
- [118] THIRY (E.), LEMAIRE (M.), SCHYNTS (F.), VANDERHEIJDEN (N.), MEYER (G.), EISPAS (M.), PASTORET (P.P.).- Les différents vaccins disponibles contre la rhinotrachéite infectieuse bovine : avantages et inconvénients. *Proceeding des Journées Nationales des GTV*, Vichy, 21-23 Mai 1997, 317-322.
- [119] THIRY (E.), LEMAIRE (M.), SCHYNTS (F.), VANDERHEIJDEN (N.), MEYER (G.), EISPAS (M.), PASTORET (P.P.).- La rhinotrachéite infectieuse bovine : caractéristiques du virus, l'infection et ses manifestations cliniques. *Bull. GTV*, 1997, **4**, 7-16.
- [120] THIRY (E.).- Maladies virales respiratoires. *In : Maladies virales des ruminants, Ed. du Point Vétérinaire, Maisons-Alfort*, 2000, 244 pages.

- [121] TIKOO (S.K.), CAMPOS (M.), BABIUK (L.A.).- Bovine Herpes virus 1 (BHV-1): biologie, pathogenesis, and control. *Adv. Virus Res.*, 1995, **45**, 191-223.
- [122] TOURATIER (A.).- L'IBR en France et en Europe, épidémiologie descriptive. *Proceeding des Journées Nationales des GTV*, Vichy, 21-23 Mai 1997, 287-288.
- [123] TSUBOI (T.), IMADA (T.).- Effect of bovine herpes virus-1, bluetongue virus and akabane virus on the in vitro development of bovine embryos. *Vet. Microbiol.*, 1997, **51**, 135-142.
- [124] VAN DER MAATEN (M.J.).- Ovarian lesions in heifers exposed to infectious bovine rhinotracheitis virus by non-genital routes on the day after breeding. *Vet. Microbiol.*, 1984/1985, **10**, 155-163.
- [125] VAN DER MAATEN (M.J.).- Ovarian lesions induced in heifers by intravenous inoculation with modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus on the day after breeding. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 1996-1999.
- [126] VAN ENGELBURG (F.A.C.), MAES (R.K.), VAN OIRSCHOT (J.T.), VAN RIJSEWIJK (F.A.M.).- Rapid and sensitive detection of BHV-1 in bovine semen by a PCR based assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, **31**, 3129-3135.
- [127] VAN ENGELBURG (F.A.C.), VAN SCHIE (F.W.), VAN RIJSEWIJK (F.A.M.), VAN OIRSCHOT (J.T.).- Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation, *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 308-312.
- [128] VAN OIRSCHOT (J.T.), STRAVER (P.J.), VAN LIESHOUT (A.H.), QUAK (J.), WESTENBRINK (F.), VAN EXSEL (A.C.A.).- A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet. Rec.*, 1993, **132**, 32-35.
- [129] VAN OIRSCHOT (J.T.), RIJSEWIJK (F.A.M.), STRAVER (P.J.), RUULS (R.C.), QUAK (J.), DAVIDSE (A.), WESTENBRINK (F.), GIELKENS (A.L.J.), VAN DIJK (J.E.), MOERMAN (A.).- Virulence and genotype of a bovine herpesvirus 1 isolate from semen of a subclinically infected bull. *Vet. Rec.*, 1995, **137**, 235-239.
- [130] VAN OIRSCHOT (J.T.).- Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet. Q.*, 1995, **17**, 29-33.
- [131] VAN OIRSCHOT (J.T.), KAASHOEK (M.J.), RIJSEWIJK (F.A.M.).- Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet. Microbiol.*, 1996, **53**, 43-54.
- [132] VANROSE (G.), NAUWYNCK (H.), VAN SOOM (A.), VANOPDENBOSCH (E.), DE KRUIF (A.).- Susceptibility of zona-intact and zona-free in vitro-produced bovine embryos at different stages of development to infection with bovine herpesvirus-1. *Theriogenology*, 1997, **47**, 1389-1402.

- [133] VANROSE (G.), NAUWYNCK (H.), VAN SOOM (A.), VANOPDENBOSCH (E.), DE KRUIF (A.).- Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhoea virus on development of in vitro-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 1999, **54**, 255-263.
- [134] VANROSE (G.), NAUWYNCK (H.), VAN SOOM (A.), VANOPDENBOSCH (E.), DE KRUIF (A.).- Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biol. Reprod.*, 2000, **62**, 463-469.
- [135] VAN SCHAIK (G.), SHOUKRI (M.), MARTIN (S.W.), SCHUKKEN (Y.H.), NIELEN (M.), HAGE (J.J.).- Modeling the effect of an outbreak of bovine herpesvirus type 1 on herd-level milk production of dutch dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 1999, **82**, 944-952.
- [136] VAN SOOM (A.), VANOPDENBOSCH (E.), MAHMOUDZADEH (A.R.), DE KRUIF (A.).- In vitro production of belgian blue cattle embryos: some data on the risk of viral infections. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, 1994, **63**, 139-145.
- [137] VAN WUIJCKHUISE (L.), BOSCH (J.), FRANKEN (P.), FRANKENA (K.), ELBERS (A.R.W.).- Epidemiological characteristics of bovine herpesvirus 1 infections determined by bulk milk testing of all Dutch dairy herds. *Vet. Rec.*, 1998, **142**, 181-184.
- [138] VESELINOVIC (S.), VESELINOVIC (Sn.), MEDIC (D.), IVKOV (V.), GRGIC (Z.), MICIC (R.).- Disturbances in bovine reproduction caused by action of IBR/IPV virus. *12th International Congress on Animal Reproduction*, 1992, **3**, 1605-1607
- [139] WAGTER (L.H.A.), GLAS (R.D.), BLEUMINK-PLUYM (N.), VAN ENGELBURG (F.A.C.), RIJSEWIJK (F.A.M.), HOUWERS (D.J.).- A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of bovine herpesvirus 1 (BHV1) in selectively digested whole bovine semen. *Vet. Res. Commun.*, 1996, **20**, 401-408
- [140] WEBER (A.).- Aborto beim Rind-mikrobiologische Befunde. *Der Praktische Tierarzt*, 1997, **78**, 661-666.
- [141] WENTINK (G.H.), VAN OIRSCHOT (J.T.), VERHOEFF (J.).- Risk of infection with bovine herpesvirus 1 (BHV-1): a review. *Vet. Q.*, 1993, **15**, 30-33.
- [142] WHITE (M.B.), SNOWDON (W.A.).- The breeding record of cows inseminated with a batch of semen contaminated with IBR virus. *Aust. Vet. J.*, 1973, **49**, 501-506.
- [143] WYLER (E.), ENGELS (M.), SCHWYZER (M.).- Infectious Bovine Rhinotracheitis / Vulvovaginitis (BHV-1).- *In: Herpesvirus diseases of cattle, horse, and pigs, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands*, 1989, 1-172.
- [144] XIA (J.Q.), YASON (C.V.), KIBENGE (F.S.B.).- Comparison of dot blot hybridization, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Can. J. Vet. Res.*, 1995, **59**, 102-109.

BHV-1 ET REPRODUCTION

BLANC Rodolphe

RESUME :

Le BHV-1 est un herpesvirus touchant presque exclusivement les bovins et dont la prévalence est très variable selon les pays. L'épidémiologie virale est très fortement marquée par le phénomène de latence virale : un animal contaminé reste porteur à vie et représente donc une source de contamination potentielle pour son environnement au cours de phases intermittentes de réexcrétion virale.

Si la forme clinique principale reste la forme respiratoire ou IBR (Rhinotrachéite Infectieuse Bovine), le virus peut être à l'origine de plusieurs troubles de la reproduction, par action directe sur les organes génitaux (vulvovaginite pustuleuse, balanoposthite, ovarite, métrite) ou sur le fœtus (avortements).

La semence constitue une voie d'excrétion importante du virus pouvant entraîner la contamination de l'animal receveur. Ceci prend toute son importance lorsque l'animal excréteur est un taureau appartenant à un centre d'insémination artificielle dont la semence sera diluée et pourra donc contaminer un nombre d'animaux très important.

Le transfert embryonnaire, de même que les embryons issus de la fécondation *in vitro*, sont des voies potentielles de contamination par le BHV-1. Si le risque semble nul pour les embryons produits *in vivo* lorsque l'on respecte les procédures recommandées par l'IETS (International Embryo Transfer Society), il n'en est pas de même pour les embryons fécondés *in vitro* pour lesquels d'autres études seront nécessaires avant de pouvoir affirmer leur innocuité.

La lutte contre le BHV-1 passe par la détection des animaux porteurs puis par l'établissement d'un plan tenant compte du type d'animal et de l'élevage dont il s'agit. L'élimination des animaux séropositifs suivi de contrôles à l'introduction par la suite est une voie possible. En milieu à forte prévalence, on peut associer la vaccination dans le but de réduire la circulation virale. Le traitement des matériaux biologiques contaminés (semence, embryons) en vue de les assainir constitue une troisième voie.

Mots-clés : BHV-1, reproduction, bovin, avortement, insémination artificielle, transfert embryonnaire

JURY :

Président : Pr

Directeur : Dr CHASTANT-MAILLARD

Assesseur : Dr MAILLARD

Adresse de l'auteur :

Rodolphe BLANC

28, rue du Givas

62560 Renty

FRANCE

BHV-1 AND REPRODUCTION

BLANC Rodolphe

SUMMARY :

The BHV-1 is an herpes virus which affects nearly exclusively cattle and the extent of which varies according to the country. The viral epidemiology characterised by the phenomena of latency : a contaminated animal remains a carrier all its life and represents a potential source of contamination around it during the temporary periods of re-excretion viral infection.

Even if the main clinical form is the respiratory one or IBR (Infectious Bovine Rhinotracheitis), the virus can be the principal cause of several reproductive problems, having a direct effect on the genital organs (infectious pustular vulvovaginitis, balanoposthitis, oophoritis, métritis) or on the foetus (abortions).

Semen is a very important way for the virus to contaminate a receiving animal. This is even more the case when it comes from a bull belonging to an artificial insemination centre where the semen will be diluted and could therefore contaminate a high number of animals.

The embryonic transfer, as well as the embryos coming from in vitro artificial fertilization are potential ways to be contaminated by BHV-1. If the risk appears slight for embryos produced in vivo artificial fertilization, according to the recommended procedures given by IETS (International Embryo Transfer Society), it is not the case for embryos fertilized by in vitro artificial fertilization and for which other research will be necessary before being able to state their innocuousness.

The fight against BHV-1 begins with the detection of seropositive animals then by establishing a plan which describes the type of animals and how they have been raised. Eliminating seropositive animals, followed by later controls before introduction is another possible way. In a high prevalence area, it is possible to give a vaccination in order to reduce the viral circulation. The treatment of biologically contaminated material (semen, embryos) so as to improve the situation is a third way.

KEY WORDS : BHV-1, reproduction, cattle, abortion, artificial insemination, embryo transfer

JURY:

President : Pr

Director : Dr CHASTANT-MAILLARD

Assessor : Dr MAILLARD

Author's Address

Rodolphe BLANC

28, rue du Givas

62560 Renty

FRANCE

