

IV. IMPACT DE LA FCO SUR LA REPRODUCTION DES BOVINS

La plupart des éleveurs ne réalisent pas l'importance de la perte économique due à des échecs de reproduction au sein du troupeau. Un faible taux de vêlage peut être dû à l'infertilité (incapacité des vaches à concevoir) ou à une mortalité embryonnaire précoce, un avortement ou une mortinatalité. Beaucoup d'avortements sont dus à des infections qui peuvent être évitées. Toute maladie causant une fièvre importante chez une vache gestante peut potentiellement causer un avortement, même si ce ne sont pas des maladies affectant le placenta ou le fœtus [WALKER, 2005].

Les effets de l'infection par le virus de sérotype 8 sur la reproduction et la fertilité des bovins n'ont pas été identifiés lors de l'émergence de 2006. Ils sont devenus inquiétants lors de l'épidémie de 2007 et son extension considérable en Europe. Toutefois, même si le diagnostic étiologique est parfois difficile à établir, aucun doute ne subsiste quant à l'association entre cette infection virale et divers troubles de la reproduction aboutissant à une augmentation de l'intervalle entre vêlages [THIRY *et al.*, 2008]. Les échecs de reproduction associés au virus de la FCO incluent des morts embryonnaires précoces, des avortements, des malformations fœtales, des stérilités et infertilités temporaires des taureaux et béliers et l'excrétion de virus dans la semence [OSBURN, 1994].

A. FCO et infertilité

La fertilité se définit comme l'aptitude à la reproduction d'un individu, ou plus exactement d'un couple. Un individu à un moment donné de sa vie peut être [BONNES *et al.*, 2005]:

- Fertile c'est-à-dire apte à féconder ou être fécondé,
- Infertile, c'est-à-dire temporairement inapte à féconder ou être fécondé,
- Stérile, c'est-à-dire définitivement inapte à féconder ou être fécondé.

La fécondité quant à elle se traduit par le fait qu'une femelle se reproduit. Elle peut donc être évaluée par le nombre de produits conduits à terme par unité de temps.

Ainsi une baisse de la fécondité au sein d'un troupeau amène à penser à un problème de fertilité. Cependant, il est extrêmement difficile de dissocier le taux de fertilité vraie (à

savoir le nombre de femelles fécondées gestantes par rapport au nombre de femelles mises à la reproduction) du taux de fertilité apparente (taux de femelles mettant bas par rapport au nombre de femelles mises à la reproduction). En effet, si une vache est constatée non gestante à un moment donné, est-ce parce qu'elle n'a jamais été fécondée ou est-ce parce qu'elle a été fécondée mais qu'un événement est survenu entretemps tel qu'une mortalité embryonnaire ou un avortement ? Quels éléments amènent à penser à des problèmes de fertilité lors d'une infection par le virus de la FCO et quelle est la part de l'infertilité vraie, qu'elle soit mâle ou femelle, dans ce cas ?

1. Baisse de la fécondité

L'Institut de l'Élevage a rendu en 2010 un rapport sur l'impact de la FCO sur le nombre de naissances des veaux en élevage allaitant [MOUNAIX *et al.*, 2010]. Une baisse du nombre de naissance de veaux de race à viande avait été observée en 2009 au niveau national pour toutes les races allaitantes et ce après deux épisodes de fièvre catarrhale ovine en 2007 et 2008. Afin de définir les impacts sur la reproduction de la fièvre catarrhale ovine, une étude avait été mise en place. Les données de la Base de Données Nationale d'Identification (BDNI) ont été analysées et montrent que, dans toutes les zones touchées par la FCO en 2007 et 2008, une baisse significative de la productivité des troupeaux est observée au cours de la campagne qui suit l'épizootie. En 2009, cela s'est traduit par une baisse du nombre de naissances de veaux de race allaitante de l'ordre de 2,7% soit une baisse de 59 457 veaux. La Bretagne, alors épargnée par la FCO, n'avait enregistré aucune variation significative de productivité de ses troupeaux allaitants. Ces constatations iraient bien dans le sens d'un impact de la FCO sur la productivité, elle-même intrinsèquement liée à la fécondité.

De plus, si l'on compare la répartition des vêlages de la campagne 2008/2009 à celle de la campagne précédente, on observe un décalage des naissances. Une baisse des naissances intervient durant le pic hivernal des mises-bas, entre janvier et mars (soit 6 à 9 mois après l'arrivée massive du virus dans les élevages). Un décalage des vêlages est observé après le pic hivernal des naissances, en fin de période estivale. Le déficit de naissances hivernales est donc en partie compensé par une augmentation des naissances enregistrées en fin de campagne, en période estivale de mai à juillet (période durant laquelle les mises-bas sont peu nombreuses normalement).

Ces résultats laissent supposer que des problèmes sont intervenus au moment de la mise à la reproduction des femelles, mais qu'ils ont été en partie surmontés durant les mois qui ont suivi. Or en 2007 comme en 2008, les périodes de forte activité vectorielle, associées à une incidence croissante de la maladie, ont eu lieu durant les mois d'été et d'automne. Ces périodes correspondent à la mise à la reproduction des animaux dans les élevages allaitants avec vêlages d'hiver et en tout début de gestation.

Au vu de la coïncidence de l'activité vectorielle avec la période de mise à la reproduction et des résultats totalement inhabituels qui ont suivi, cette étude confirme les impacts de la FCO sur les résultats de la reproduction dans les élevages bovins allaitants : baisse du nombre de naissances et troubles de la reproduction induisant un décalage des vêlages en période estivale.

La suite des événements a confirmé la tendance puisque dès la mise en place d'actions par les professionnels pour limiter les effets de l'épizootie, et notamment grâce aux campagnes de vaccination débutées dès 2008, la baisse du nombre de veaux s'est avérée être un événement ponctuel et un retour aux niveaux habituels de naissances a été observé au cours de la campagne 2009/2010.

Ce déficit de naissances associé à leur décalage ne peut s'expliquer par deux effets connus de la FCO : la baisse de fertilité transitoire des mâles et les altérations de la fertilité des femelles (retour des chaleurs, infertilité vraie et avortements précoces, infertilité apparente). Une telle baisse des naissances n'a pas été observée dans la filière lait : ceci peut s'expliquer par plusieurs éléments, liés à la conduite d'élevage particulière de ces troupeaux [MOUNAIX (2009b)] :

- Tout d'abord, le recours à l'insémination artificielle est beaucoup plus fréquent : l'utilisation de ces semences à la qualité contrôlée enlève le problème de l'infertilité possible des taureaux à l'inverse des troupeaux allaitants où la monte naturelle est souvent largement prédominante ;

- Ensuite, le contrôle de gestation est régulier et précoce et la constatation d'une vache non gestante amènera rapidement à sa remise à la reproduction. Cela est bien différent du système allaitant où les vaches sont souvent laissées en pâture l'été plusieurs mois et font l'objet d'une moins grande surveillance. Le constat de

non-gestation est tardif et parfois uniquement basé sur des critères morphologiques, à la rentrée automnale à l'étable ;

- Enfin, la venue biquotidienne à la traite des laitières permet une surveillance rapprochée du troupeau et divers signes évocateurs d'infection par le virus de la FCO pourront alarmer les éleveurs qui seront plus vigilants sur la reproduction.

2. Infertilité mâle

Plusieurs études décrivent une infertilité transitoire à la suite d'une infection aiguë par le virus de la FCO chez le bélier et le taureau sexuellement matures [OSBURN, 1994]. Diverses explications sont avancées pour expliquer ce phénomène.

a. Infertilité indirecte

D'une part, l'hyperthermie a des effets connus chez le mâle sur les hormones de la reproduction (pouvant entraîner une baisse de la libido) et sur la qualité des gamètes. La qualité de la semence s'en retrouve donc altérée.

Chez le bélier, les impacts du virus de la FCO sont majeurs et on note ainsi dans une étude de KIRSCHVINK *et al.* (2008) de nombreuses altérations de la qualité de la semence (oligospermie, nécrospermie, tératospermie, azoospermie, asthénospermie). Cette infertilité est cependant transitoire puisque sa durée à la suite de l'épisode d'hyperthermie proprement dite est fonction de la période de spermatogenèse (49 jours chez le bélier) nécessaire pour retrouver une production de spermatozoïdes normale : un retour à la normale peut être espéré entre 63 et 138 jours après l'infection par le sérotype 8 [KIRSCHVINK *et al.*, 2008].

Si peu d'études ont été réalisées chez le taureau, on peut s'attendre à des effets similaires de l'hyperthermie puisqu'on observe classiquement 6 à 8 semaines d'infertilité chez des taureaux infectés par le virus de la FCO, ce qui est en accord avec la durée de la spermatogenèse chez le taureau (61 jours).

Deux études ont tout de même été menées chez le taureau lors de la récente épizootie à sérotype 8. Elles peuvent nous permettre d'appuyer deux constatations réalisées chez le bélier :

- Les anomalies de spermatogenèse faisant suite à une infection par le virus de la FCO ;
- L'impact à effet limité dans le temps de cette infection.

La première étude a été réalisée en Allemagne sur six taureaux naturellement infectés par le sérotype 8 du virus de la FCO entre septembre et novembre 2007 (devenus positifs en PCR à cette période) et devenus uniquement positifs en sérologie entre avril et mai 2008 [MULLER *et al.* (2010)]. Leurs semences ont été appariées en fonction de la saison et de l'âge avec des données de semence récoltées entre 2006 et 2007 de taureaux non infectés, utilisés comme témoins. Le volume d'éjaculat, la concentration spermatique, la motilité post décongélation et la proportion de spermatozoïdes anormaux morphologiquement ont été suivis.

Il a ainsi été montré que l'infection par le sérotype 8 n'a pas d'impact ni sur le volume spermatique, ni sur la concentration en spermatozoïdes. Cependant, elle réduit la motilité spermatique après décongélation, la quantité minimum requise étant de 50% de spermatozoïdes motiles (janvier-août 2008 $44,1 \pm 12,7\%$ contre $58,0 \pm 7,9\%$ chez les non infectés, $p < 0.001$). A partir de septembre 2008, tous les taureaux atteints de FCO sont revenus à des valeurs normales.

De plus, des anomalies similaires à celles rapportées par KIRSCHVINK *et al.* (2008) dans leur étude sur la semence de bélier ont été rapportés. On observe notamment des queues bouclées, avec une queue en forme d'arc, détachée, entourée autour de la tête ou seulement rudimentaire. La proportion de spermatozoïdes anormaux dans les semences fraîches et décongelées des taureaux infectés était au-dessus des 20% autorisés de décembre 2007 à février 2008 puis retrouvait des valeurs normales. Au total, 35% des éjaculats (semence fraîche) échantillonnés durant le temps de virémie était au-dessus de la limite maximum de 20% de spermatozoïdes.

Ces observations indiquent que l'infection par le sérotype 8 a des conséquences défavorables sur la fertilité des bovins mâles avec une proportion accrue de spermatozoïdes à morphologie aberrante pendant la virémie.

Une autre étude clinique a été effectuée durant l'hiver 2008/2009 sur 26 taureaux de race allaitante (Charolais, Gascons, Aubrac et Limousin) âgés de 2 à 9 ans du Sud-Ouest de la France afin d'évaluer l'effet de l'infection par le virus de la fièvre catarrhale ovine sur la fonction sexuelle [SICARD *et al.* (2009)]. Ces taureaux étaient vaccinés contre les sérotypes 1 et 8 de la FCO depuis plus de deux mois, ce qui permettait d'écarter tout effet sur la spermatogenèse liée à l'hyperthermie potentiellement engendrée par la vaccination. Le statut infectieux des taureaux a été déterminé par sérologie et virologie. La sérologie visait à mettre en évidence des anticorps dirigés contre la protéine VP7 (présents chez les animaux infectés naturellement et chez les animaux vaccinés) et contre une protéine non structurale du virus (n'entraînant pas de réponse immunitaire vaccinale).

Tous les taureaux ont subi une inspection et palpation des organes génitaux. Du sperme a été collecté par électro-éjaculation afin d'évaluer précisément la qualité du sperme.

Sur les 26 taureaux :

- Quatre présentaient une anomalie de l'appareil génital : une hypoplasie du testicule gauche, un fibropapillome de la verge, une hyperkératose scrotale marquée et un abcès du scrotum. Dans ces deux derniers cas, une détérioration de la qualité du sperme a été constatée sans que celle-ci ne puisse être rattachée au virus de la FCO puisque les deux pathologies constatées peuvent par elles-mêmes être à l'origine d'un défaut de thermorégulation, pouvant être responsable d'une modification de la spermatogenèse ;
- Deux n'ont pas pu être collectés malgré deux tentatives par électro-éjaculation ;
- Trois éjaculats sur vingt-quatre (12.5%) étaient de qualité médiocre (concentration en spermatozoïdes insuffisante, motilité massale ou individuelle insuffisantes, pourcentage de spermatozoïdes morts élevé). Des trois taureaux concernés, seuls deux ont été infectés par le virus de la FCO (sérologie positive) mais n'étaient plus porteurs au moment du prélèvement (virologie négative) ;
- Huit taureaux étaient positifs en PCR avec une qualité d'éjaculat normale ;

- Toutefois l'absence de mesure de Ct ne permet pas de conclure à une virémie active.

Cette étude confirme l'absence d'effet à long terme d'une infection par le virus de la FCO sur la fonction de reproduction des taureaux. L'infertilité décrite chez les taureaux en phase aiguë de la maladie ne semble pas persister au-delà de quelques mois. Il est donc conseillé aux vétérinaires praticiens de faire preuve d'une grande prudence avant d'écarter définitivement de la reproduction un taureau constaté stérile suite à une infection par le virus de la FCO.

b. Infertilité directe

Si l'hyperthermie est fréquente chez les béliers dans le cas d'une infection par le virus de la FCO, les bovins ont classiquement une hyperthermie moins marquée. La raison de l'altération de la fertilité des taureaux dans ce cas n'est toujours pas élucidée. De ce fait, d'autres hypothèses sont avancées et notamment des lésions testiculaires, principalement vasculaires, engendrées par le virus qui pourraient expliquer ce phénomène [OSBURN, 1994]. Les troubles de la fertilité peuvent alors être irréversibles en cas de lésions persistantes (fibrose interstitielle, calcification intratubulaire...).

On peut donc en conclure que l'infection par le virus de la FCO de taureaux peut avoir des conséquences dramatiques au sein d'un troupeau. Par le biais de l'infertilité transitoire induite, cette conséquence est l'une des plus durables de ce virus au sein d'un troupeau. Toute négligence a effectivement des conséquences dramatiques en élevage allaitant, si la stérilité du taureau n'est pas détectée à temps durant la période de saillie. Néanmoins, si cette infertilité semble dans la majeure partie des cas limitée dans le temps, il convient d'être prudent car la libido revenant avant la fertilité, il faut veiller à tester la qualité de la semence avant de remettre un reproducteur à la saillie.

3. Infertilité femelle

Il est reconnu que l'infection par le virus de la FCO induit une réduction du nombre de gestations [THIRY *et al.*, 2008]. Les principales manifestations génitales de l'infection chez la femelle sont :

- un allongement de l'intervalle vêlage –fécondation ;
- un taux de réussite en première insémination artificielle (IA) détérioré ;
- un accroissement de l'âge au premier vêlage.

Les effets d'une infection par le virus de la FCO chez la femelle peuvent être visibles pendant une durée correspondant au cycle de production des gamètes (croissance folliculaire = délai pour obtenir un ovule), soit 60 à 90 jours.

Encore une fois on peut soupçonner un impact direct et un impact indirect de l'infection par le virus.

a. Infertilité indirecte

Comme chez le mâle, l'hyperthermie accompagnant un épisode clinique de FCO peut avoir des effets non négligeables sur la reproduction (par le biais de son impact sur les taux d'hormones circulants et la qualité des gamètes). Les effets attendus sont très proches de ceux entraînés par un stress thermique. Celui-ci affecte la reproduction à plusieurs niveaux [WOLFENSON *et al.*, 1997] :

- suppression de la dominance folliculaire,
- réduction des taux d'œstrogènes,
- diminution du nombre et de la qualité des ovocytes,
- impacts sur l'embryon.

b. Infertilité directe

Comme chez le mâle, les autres phénomènes dus à la pathogénie du virus et permettant d'expliquer une baisse de la fertilité des femelles sont encore mal connus bien que soupçonnés.

c. Infertilité apparente vs infertilité vraie

Suite à l'épizootie survenue en 2007, l'Institut de l'Élevage a mené une étude basée sur les données nationales (système d'information génétique (SIG) foyers de FCO déclarés) visant à établir la probabilité d'une relation entre la diminution du taux de réussite à l'IA et l'épizootie de FCO de la même année [MOUNAIX *et al.*, 2008]. Seuls les élevages laitiers ont été retenus car trop peu d'élevages allaitants avaient recours à l'IA. De plus, ces derniers employaient trop fréquemment le taureau en rattrapage en cas d'échec, faussant les résultats.

Les résultats de cette étude ont montré un nombre moyen d'IA par vache supérieur dans les élevages foyers par rapport aux élevages indemnes. De plus, les comparaisons statistiques menées chez les génisses comme chez les vaches montrent un taux de non retour après IA toujours inférieur dans les élevages foyers (le non retour signifie qu'une première IA réalisée n'a pas été suivie d'une deuxième IA, donc la femelle est présumée gestante). Si les différences ne sont pas significatives chez les génisses, elles le sont pour les vaches pour les non retours à 56 et 90 jours. La baisse de succès à l'IA atteint 6% à 56 jours et 12% à 90 jours. Ces analyses indiquent donc un effet probable de la FCO sur le succès des IA réalisées lors du pic de contamination.

Le faible impact chez les génisses peut s'expliquer de deux manières : d'une part car plusieurs études antérieures montrent que la morbidité est plus forte chez les vaches que chez les génisses et d'autre part car chez les génisses en élevage laitier, l'utilisation d'un taureau en rattrapage est courant et fausse donc les résultats. En effet, les génisses « rattrapées » par le taureau constituent des résultats biaisés puisqu'elles ne seront pas revues à l'IA (bien que l'IA ait échoué et que la gestation soit le fait du taureau) [MOUNAIX *et al.*, 2008].

L'effet de la FCO sur le succès de l'IA semble être reporté en milieu de gestation puisque la différence observée est significative à partir de 56 jours et augmente à 90 jours. Cela confirme les dires des éleveurs lors de différentes enquêtes qui constataient des avortements inhabituels surtout en fin de gestation et de nombreuses vaches vides alors que celles-ci avaient été déclarées gestantes lors du diagnostic de gestation effectué. L'impact du virus de la FCO sur la fertilité des femelles toucherait donc plus la fertilité apparente. Il semblerait que l'on soit plutôt dans le cas de mortalités embryonnaires ou d'avortements

amenant à des constats tardifs de non gestation et donc d' « infertilité » mais qu'il n'y ait pas d'infertilité vraie à savoir d'incapacité à être fécondée du fait de l'infection.

Les résultats de cette étude sont peut-être biaisés car la majorité des élevages laitiers cherchent à produire un lait d'hiver et donc mènent leurs IA entre décembre et février qui est une période d'inactivité vectorielle. Il est donc probable qu'à l'échelle de l'élevage on observe de plus grandes baisses de performances de reproduction pour des élevages effectuant leurs IA à l'automne lors du pic d'incidence de la FCO. Les effets pourraient alors être plus précoces et directement liés à la fertilité vraie puisque les gamètes ou l'environnement utérin pourraient être sous le coup d'une infection récente au virus.

B. FCO, saillie naturelle et reproduction assistée

Pour comprendre les peurs liées à la FCO, il faut rappeler certaines études américaines des années 70 menées par LUEDKE *et al.* (1977) qui tendaient à prouver que non seulement la FCO pouvait se transmettre de manière verticale, mais que certaines des progénitures devenaient immunotolérantes et étaient virémiques persistantes. Plus tard, un taureau issu d'une mère contaminée avait excrété du virus dans sa semence pendant une longue période (onze ans) et engendré 12 veaux infectés permanents. Sans surprise, ces constatations amenèrent un durcissement des restrictions pour le commerce international des semences et plus tard des embryons depuis les régions endémiques [WRATHALL *et al.*, 2006].

Cependant, de nombreux chercheurs tentèrent de confirmer ces résultats mais plus aucune étude ensuite ne corrobora l'existence d'infections persistantes. De là, PARSONSON réfuta catégoriquement l'existence d'infectés permanents immunotolérants et dans les décennies suivant son rapport, son point de vue a été largement accepté dans la profession vétérinaire [WRATHALL *et al.*, 2006].

1. Excrétion du virus dans le sperme et contamination par voie vénérienne

De nombreux virus ont la capacité de s'attacher aux spermatozoïdes ou d'y être intégrés. Néanmoins, cela semble être un très rare phénomène chez les animaux domestiques

et notamment chez les bovins. Le transport d'un virus à travers la zone pellucide dans l'ovocyte par un spermatozoïde n'a de ce fait jamais été décrit dans ces espèces jusqu'à maintenant [WRATHALL *et al.*, 2006].

Si le virus de la FCO ne fait pas exception et n'a donc jamais été retrouvé lié aux spermatozoïdes, il a été isolé dans les testicules, les vésicules séminales, les glandes bulbo-urétrales, la prostate et l'urètre distal. Les mâles en phase d'infection aiguë peuvent excréter le virus dans le sperme, mais uniquement durant la période de virémie. Le titre viral dans le sperme est directement corrélé à la charge virale sanguine car c'est principalement la présence dans le sperme de cellules mononucléées ou d'érythrocytes infectés qui en expliquent son infection [OSBURN, 1994]. Un taureau séropositif mais dont le sang est vironégatif, n'excrète plus le virus dans le sperme [THIRY *et al.*, 2008].

D'autres études avec des infections expérimentales par les sérotypes 10, 11, 13 et 17 montrent que la présence de virus dans le sperme reste sporadique chez les taureaux en virémie. Et encore la fréquence est-elle surévaluée car le risque d'infection du sperme est plus grand avec des souches de virus adaptées sur cultures cellulaires. Un tiers des taureaux infectés expérimentalement présentent des éjaculats viropositifs et, dans l'ensemble des éjaculats récoltés chez ces taureaux positifs en période de virémie, seul 10% présentent du virus infectieux. Il est vraisemblable que la répétition de telles études avec les méthodes actuelles de RT-PCR en temps réel donneraient plus de résultats positifs [THIRY *et al.*, 2008 ; DAL POZZO *et al.*, 2009]. Toutefois la virospermie peut persister chez ces taureaux pendant 2 à 3 semaines [SICARD *et al.*, 2009]. Dans le cadre d'infection naturelle, la détection de virus dans le sperme est encore plus rare. Sur 18 000 échantillons de semence testés pour le virus de la FCO aux Etats-Unis, seuls deux se sont avérés contaminés par du virus de la FCO [OSBURN, 1994].

Il est donc admis que la FCO peut sporadiquement se trouver dans la semence de taureaux virémiques [WRATHALL *et al.*, 2006]. Bien que marginale, la détection d'une virospermie laisse supposer une transmission vénérienne possible de l'infection. En effet, alors qu'au départ la FCO est une maladie non contagieuse *stricto sensu*, l'infection peut se transmettre aussi par la saillie. Ce phénomène est cependant rare et ne présente pas une importance épidémiologique significative dans un contexte où l'infection est largement répandue. Au cours d'une infection expérimentale, 3 génisses sur 9 se sont retrouvées

infectées après l'insémination avec du sperme viropositif. Aucune infection fœtale ultérieure n'a été mise en évidence chez ces génisses [THIRY *et al.*, 2008].

2. Semence contaminée et insémination artificielle

a. Qualité du sperme après décongélation

Dans l'étude précédemment citée de MULLER (2010) sur 6 taureaux naturellement infectés par le sérotype 8, des anomalies morphologiques des spermatozoïdes avaient été constatées mais également des problèmes de motilité post-décongélation. Celle-ci était réduite par rapport aux taureaux non infectés et était même en dessous du taux minimum requis pendant plusieurs mois, bien au-delà du temps de virémie positive par PCR.

L'infection par le virus de la FCO induit donc une baisse de la qualité du sperme notamment après décongélation. Cela peut poser des problèmes de qualité pour d'éventuelles paillettes utilisées en IA produites à partir d'une semence de taureau ayant été infecté par le virus de la FCO.

b. Restriction de l'usage des semences

L'IA est un élément clé pour l'amélioration génétique de la bovine et de ce fait, des millions de doses sont produites annuellement à travers le monde. Les mouvements internationaux ont de plus considérablement augmenté et les échanges de sperme nécessitent une attention particulière quant à l'état sanitaire des animaux donneurs. Etant donné que la FCO peut être potentiellement transmise par le sperme, que la maladie a connu une expansion récente ces dernières années et que des millions de doses de semence bovine sont commercialisés annuellement de par le monde, il convient d'adopter une certaine vigilance vis-à-vis des semences. Des mesures ont ainsi été adoptées afin de prévenir la transmission de la FCO par le biais des semences, amenant des restrictions au niveau du commerce international.

Dans l'Union Européenne, la directive 2000/75/EC établit des mesures de contrôle pour combattre le virus de la FCO incluant l'interdiction du mouvement de semences issues de centres de collectes situés dans des zones réglementées [EUR-LEX, 2000]. L'annexe III du

règlement 1266/2007/EC inclut les conditions d'exemption permettant de lever cette interdiction [EUR-LEX, 2007] : les semences doivent avoir été collectées sur des animaux gardés avant et pendant la collecte hors d'une zone réglementée et protégés contre les vecteurs au moins 60 jours avant le début de la collecte, ou bien gardés dans une zone touchée saisonnièrement par la FCO mais durant la période d'inactivité vectorielle. Les donneurs doivent aussi être soumis à des tests diagnostiques avec des résultats négatifs (tous les 60 jours pour les tests sérologiques ou tous les 28 jours pour les tests PCR).

Toutefois ces conditions sont difficiles à remplir car le virus de la FCO peut apparaître hors de zones réglementées et la probabilité de sa détection dépend de facteurs tels que la vigilance des éleveurs et l'efficacité des mesures de surveillance et de contrôle dans la région.

c. Insémination expérimentale avec de la semence contaminée

Dans l'étude de SCHLAFER *et al.* (1990), deux vaches superovulées inséminées avec de la semence contaminée par du virus de la FCO sont devenues infectées bien qu'elles n'aient montré aucun signe clinique. Elles ont été autopsiées 6 jours après l'insémination. Du virus a été isolé du sang, des prélèvements vaginaux, des ovaires, de la corne utérine, du col, de la rate et de la moelle épinière d'un ou deux animaux après un à trois passages en culture cellulaire. Aucune lésion macroscopique n'a été observée mais des infiltrations focales modérées par des cellules mononucléées ont été observées lors de l'examen microscopique de l'endomètre.

Lors d'une autre expérience de THOMAS *et al.* (1986) durant laquelle trois donneuses séronégatives ont été fécondées avec de la semence infectée, deux d'entre elles sont devenues virémiques. Toutefois les liquides de lavement utérins issus des donneuses étaient exempts de virus et six des neuf receveuses ont donné naissance à des veaux en pleine forme ; aucune des receveuses ou veaux ne développèrent d'anticorps contre le virus de la FCO.

Si la virospermie est peu fréquente, elle est tout de même considérée comme possible. Assurer qu'une semence est exempte de virus de la FCO, notamment lorsque les taureaux proviennent de régions contaminées saisonnièrement ou toute l'année reste difficile. Si la semence se doit d'être exportée, notamment vers des pays indemnes de FCO, il est bien normal que ces pays attendent de la semence d'en être exempte. Les taureaux doivent

provenir de régions saines ou ayant été amenés 100 jours avant et pendant la collecte du sperme dans une zone exempte. Ou alors ces taureaux doivent être sérologiquement négatifs à deux tests réalisés 28 et 60 jours après la dernière collecte. Quand les taureaux se trouvent dans des zones infectées, il est recommandé de les maintenir à l'écart des vecteurs 100 jours avant et pendant la collecte (ce qui bien sûr est difficile). Alternativement, si les taureaux sont sérologiquement positifs, ils peuvent subir des tests d'isolement viral ou bien de PCR sur des échantillons de sang prélevés au début et tous les 7 jours ou au moins 28 jours pendant la collecte de semence pour confirmer l'absence de virus. Si les régions sont infectées saisonnièrement, la collecte doit se faire 100 jours au moins avant le début de la période d'activité vectorielle [WRATHALL *et al.*, 2006].

Le risque de transmission de la FCO associé au potentiel d'un animal non clinique de servir de réservoir pour la dissémination du virus ont amené à de grandes contraintes dans le commerce international de ruminants ainsi que leur semence et embryons, en particulier dans des régions où le vecteur est présent et où sont présents de grande population de moutons.

3. Transfert embryonnaire

Le transfert d'embryons pourrait également être une technique à risque pour la transmission de l'infection par le virus de la FCO à des receveuses sensibles. Le virus est en effet présent dans l'environnement utérin au moment de l'ovulation chez une vache en période de virémie [WRATHALL *et al.*, 2006]. On a également déjà vu plus haut que les semences pouvaient être contaminées.

Les méthodes utilisées pour produire des embryons exempts de pathogène comprennent le test des animaux donneurs avant et après la collecte, le traitement des embryons ou les deux. Cependant le traitement seul des embryons est moins coûteux et chronophage que les deux autres approches.

La justification de l'utilisation du processus de lavage seul des embryons est :

- son faible coût,
- sa facilité d'inclusion dans les schémas de production d'embryons,
- son efficacité à limiter la transmission de pathogènes lorsque les embryons sont collectés sur des donneurs exposés ou infectés et transférés à des receveurs sains.

De façon générale, la méthode standardisée de la Société Internationale de Transfert d'Embryons (IETS) est la suivante [STRINGFELLOW et GIVENS, 2000 ; WRATHALL *et al.*, 2006] :

- sélection sous microscope des embryons : sont écartés tous ceux présentant une zone pellucide abimée ou ayant des débris cellulaires qui leur sont accrochés et que l'on ne parvient pas à retirer grâce à un pipetage ;
- pas plus de 10 embryons lavés avec une zone pellucide intacte par groupe ;
- au moins 10 lavages, dans une solution saline tamponnée stérile, contenant habituellement 0.4% d'albumine sérique bovine et des antibiotiques à large spectre ;
- l'utilisation de pipettes stériles pour chaque lavage pour manipuler les embryons ;
- chaque lavage est au moins une dilution au centième du lavage précédent ;
- après les lavages, les embryons sont observés au moins au grossissement 50 pour s'assurer que la zone pellucide est toujours intacte et sans débris collés.

Des bains de trypsine peuvent être ajoutés. On passe alors les embryons dans 5 puits puis dans deux solutions de solution saline tamponnée avec 0,25% de trypsine, sans Ca^{2+} ou Mg^{2+} et avec des antibiotiques pendant 60-90 secondes. Puis on les repasse dans les cinq derniers puits. La trypsine est une enzyme protéolytique qui digère les couches externes de la zone pellucide sur lesquelles le virus peut être collé.

L'objectif de cette procédure de traitement des embryons est de les désinfecter c'est-à-dire de supprimer ou rendre inactif tout pathogène potentiel présent mais sans affecter la viabilité de l'embryon.

Dans le cas particulier de la FCO, diverses études ont été menées afin d'évaluer les conditions dans lesquelles la production d'embryons contaminés était possible mais aussi le risque de transmettre le virus par le biais du transfert de ces embryons en mettant en place le protocole de lavage de l'IETS.

a. Embryons exposés in vivo

➤ Insémination avec de la semence contaminée

Dans l'étude précédemment citée de SCHLAFER *et al.* (1990) où deux vaches avaient été inséminées avec de la semence contaminée par du virus de la FCO et avaient été infectées, l'une d'elle avait produit 7 embryons. Quatre des sept embryons produits s'étaient bien développés. Cinq embryons ont été placés dans des cultures cellulaires et aucun effet cytopathique n'a été observé. Deux autres ont été observés au microscope électronique et aucune particule virale n'a été observée.

➤ Infection des vaches donneuses d'embryons

Cinquante-neuf génisses ont été infectées avec du sérotype 11 et, durant la phase aiguë de la virémie 12 à 16 jours après inoculation, 169 embryons ont été collectés de 59 génisses et soumis aux protocoles de traitement de l'IETS. Cinquante-sept de ces embryons ont été testés pour le virus de la FCO *in vitro* en les inoculant à des cultures cellulaires ou à des œufs de poule embryonnés : aucun ne s'est révélé contaminé. Les 110 autres ont été transférées chez des receveuses et 36 veaux en sont nés. Toutes les receveuses et leur progéniture restèrent FCO séronégatifs [ACREE *et al.* cités par WRATHALL *et al.*, 2006].

Dans une autre étude (BOWEN *et al.*, 1983), des embryons ont été récupérés sur des vaches donneuses lors du pic de virémie après inoculation des sérotypes 10, 11, 13 ou 17. Ils ont ensuite été transférés chirurgicalement à des receveuses séronégatives 7-8 ou 10-11 jours après le début d'œstrus des donneuses.

A chaque fois, deux embryons par sérotype et par stade embryonnaire (soit embryons avec zone pellucide intacte, soit blastocyste éclos) ont été transférés par receveuses. Deux embryons sains, 9 anormalement développés et 14 stades une cellule, probablement non fécondés, ont été examinées par immunofluorescence et aucun antigène viral n'a été détecté.

Le virus a été isolé du lavage utérin de 11 des 20 donneuses. Le virus de la FCO n'a été isolé du sang d'aucune des 39 receveuses et aucune n'a séroconverti après le transfert.

Le nombre de receveuses devenues gravides après le transfert d'embryons (21/39) n'était pas différent de témoins contemporains, ce qui suggère que l'infection virale n'induit

pas de mortalités embryonnaires. L'antigène viral n'a pas été détecté par immunofluorescence dans aucun des 63 embryons et ovocytes issus des donneurs virémiques. Ces résultats montrent que sous des conditions standard de transfert d'embryons, la transmission de la FCO est improbable [BOWEN *et al.*, 1983].

b. Embryons exposés *in vitro*

Trois embryons de 7 jours ont été exposés *in vitro* au virus de la FCO pendant 18-24 heures et par la suite lavés au maximum 3 fois et transférés par voie chirurgicale à des receveuses synchronisées. Aucune des trois génisses n'est devenue gravide mais les trois ont développé des titres d'anticorps spécifiques neutralisants sans montrer de signes cliniques. Les niveaux de progestérone ont été surveillés pendant 54 jours et étaient normaux. Le virus a été isolé du sang et d'un écouvillon vaginal prélevé 7 jours après le transfert chez une génisse mais pas des deux autres [SCHLAFER *et al.*, 1990].

Des ovocytes bovins entourés de cellules folliculaires épithéliales ont été exposés à du virus FCO de sérotype 1 (souche vaccinale dérivée d'un isolat sud-africain), maturés en culture pour 24h et ensuite fécondés *in vitro*. Une réplication du virus a été observée dans les cellules folliculaires épithéliales pendant le développement *in vitro* de l'embryon en blastocyte mais le développement des embryons témoins (sans infection virale) et ceux exposés au virus de la FCO ne sont pas différents. Le virus ne parvient pas à infecter la zone pellucide intacte des ovocytes ou embryons. Celle-ci est d'ailleurs connue pour être une barrière de protection contre la pénétration de virus chez les bovins. Si cette barrière était compromise au cours du lavage, de la congélation, de la micromanipulation... de l'embryon, cela pourrait autoriser l'infection directe de ce dernier [TSUBOI et IMADA, 1997]. On peut alors penser que l'exposition directe du blastocyte ou encore de l'embryon déjà éclos amènerait sa destruction par l'action cytotytique du virus [OSBURN, 1994].

Cependant, dans quelques études, le virus de la FCO fait partie des virus qui ont une affinité plus marquée pour les embryons issus de fécondation *in vitro*. Ainsi, le virus est parfois retrouvé sur des embryons obtenus *in vitro* malgré le traitement de ceux-ci selon les procédés de l'IETS. Toutefois aucune étude n'a montré si les doses de pathogène retrouvées étaient infectantes et aucun incident de contamination par cette voie de production n'a jamais été rapporté [LANGSTON *et al.*, 1999 ; STRINGFELLOW et GIVENS, 2000].

Bien que le transfert d'embryons semblait *a priori* conférer un risque de transmission du virus si l'on s'assure que la zone pellucide des embryons est intacte et si l'on respecte le protocole de lavage de l'IETS, il semble tout à fait improbable de transmettre le virus de la FCO par ce biais.

Au vu de la possibilité que la FCO puisse être transmise *via* des embryons prélevés *in vivo*, de nombreuses expérimentations ont été menées et ont montré de manière convaincante que, au moins pour les embryons lavés selon les préconisations de l'IETS, le virus n'est pas transmis. Ces protocoles sont largement acceptés et appliqués lors du commerce international. Si l'utilisation de semence contaminée semble bien plus problématique, l'utilisation de semence contaminée pour la production d'embryons n'est pas un risque pour ces derniers étant donné le protocole mis en œuvre. D'ailleurs, des milliers d'embryons bovins ont été échangés de par le monde sans qu'aucun n'ait jamais été mis en cause dans la transmission de la FCO. Il en résulte la classification par l'IETS du virus de la FCO dans la catégorie 1 à savoir « un agent de maladie pour lequel il y a des preuves suffisantes qui montrent que le risque de transmission est négligeable dans la mesure où les embryons sont correctement manipulés entre la collection et le transfert » [WRATHALL *et al.*, 2006].

C. FCO et répercussions fœtales et embryonnaires

L'embryon est défini comme la part du conceptus qui devient le nouveau-né depuis la fécondation jusqu'à la fin de l'organogenèse (42^{ème} jour chez la vache). Ensuite, on parle de fœtus de l'organogénèse jusqu'à la fin de la parturition. Lors d'une infection maternelle par un agent infectieux, le développement fœtal peut être altéré [GIVENS et MARLEY, 2008]. Si, parfois, l'impact est uniquement lié aux effets induits par le virus (tels que le stress maternel, l'hyperthermie induite...), celui-ci est parfois lié au virus lui-même soit car il infecte le placenta ou bien, s'il est capable de passer la barrière placentaire, car il atteint directement l'embryon. Il peut alors s'ensuivre une mort fœtale, des avortements ou des déficits du développement (tératogénèse). L'issue de l'infection virale du fœtus dépend de la sensibilité de celui-ci à l'agent pathogène. Celle-ci est le résultat d'une combinaison entre l'âge du fœtus au moment de l'exposition et la virulence de la souche virale en cause

[MACLACHLAN *et al.*, 2000]. En effet, la formation d'une anomalie congénitale survient à la conjonction de plusieurs conditions dont les principales sont [DUVAL-DESNOES, 2005] :

- la présence d'un agent tératogène,
- une exposition suffisante à cet agent,
- la sensibilité de l'espèce à cet agent,
- l'exposition à un stade de l'ontogénèse présentant une sensibilité particulière à cet agent.

Ainsi, la genèse d'une dysmorphose n'est permise que par une fenêtre plus ou moins étroite d'exposition à un agent tératogène. Si l'exposition est importante, il y aura des anomalies plus sévères ou des anomalies multiples (bien que généralement un agent tératogène donné produit un nombre restreint d'anomalies, fonction de sa plus ou moins grande spécificité d'organes et de son mode d'action) alors qu'au contraire l'exposition est faible il n'y aura pas ou peu d'anomalies [DUVAL-DESNOES, 2005].

La période d'action du facteur tératogène au cours du développement conditionne la tératogénèse : durant la période embryonnaire, les jeunes ébauches sensibles répondent à l'agent tératogène par la loi du « tout ou rien », et s'ensuivent en général des malformations majeures à monstrueuses ; durant la période fœtale en revanche, les organes, souvent mieux protégés, peuvent rester sensibles ou même acquérir une nouvelle sensibilité et évoluer en produisant des malformations ou des déformations, souvent moins sévères. Ainsi la précocité d'action d'un agent tératogène est-elle synonyme de gravité des lésions du conceptus, qui a d'autant moins de chances de poursuivre son développement que l'agent tératogène agit tôt et à de fortes doses. Les structures embryonnaires ne peuvent évoluer vers la tératogénèse qu'à partir du stade de la différenciation des couches germinatives, et l'embryon est totalement protégé avant la nidation. Enfin l'interférence d'un agent tératogène avec la nidation, la blastula ou la gastrula se solde habituellement par une mort embryonnaire précoce. A l'inverse, la période de sensibilité à un agent tératogène se termine graduellement avec la fin de la formation de l'organe concerné [DUVAL-DESNOES, 2005].