



**HAL**  
open science

# Risque de transmission par le chien mâle de l'herpesvirus canin (CHV-1) : étude du pouvoir infectieux du sperme et mise en évidence de son effet inhibiteur sur la PCR

Julia Mangin

## ► To cite this version:

Julia Mangin. Risque de transmission par le chien mâle de l'herpesvirus canin (CHV-1) : étude du pouvoir infectieux du sperme et mise en évidence de son effet inhibiteur sur la PCR. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. dumas-04907571

**HAL Id: dumas-04907571**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04907571v1>**

Submitted on 23 Jan 2025

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2024 - Thèse n° 122

**RISQUE DE TRANSMISSION PAR LE CHIEN MALE DE  
L'HERPESVIRUS CANIN (CHV-1) : ETUDE DU POUVOIR  
INFECTIEUX DU SPERME ET MISE EN EVIDENCE DE SON  
EFFET INHIBITEUR SUR LA PCR**

**THÈSE**

pour l'obtention du diplôme d'État de

**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

le 13/11/2024

par

**Julia, Lucie, Sarah MANGIN**

Sous la direction de

**Lionel MARTIGNAT et Djemil BENCHARIF**

**Président du jury :** Monsieur FREOUR Thomas.....Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

**Membres du jury :**

Monsieur MARTIGNAT Lionel..... Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes-Atlantique-ONIRIS

Monsieur BENCHARIF Djemil..... Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes-Atlantique-ONIRIS

Monsieur BERTHO Nicolas..... Chargé de recherche à l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement



ANNEE 2024 - Thèse n° 122

**RISQUE DE TRANSMISSION PAR LE CHIEN MALE DE  
L'HERPESVIRUS CANIN (CHV-1) : ETUDE DU POUVOIR  
INFECTIEUX DU SPERME ET MISE EN EVIDENCE DE SON  
EFFET INHIBITEUR SUR LA PCR**

**THÈSE**

pour l'obtention du diplôme d'État de

**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

le 13/11/2024

par

**Julia, Lucie, Sarah MANGIN**

Sous la direction de

**Lionel MARTIGNAT et Djemil BENCHARIF**

**Président du jury :** Monsieur FREOUR Thomas.....Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

**Membres du jury :**

Monsieur MARTIGNAT Lionel..... Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes-Atlantique-ONIRIS

Monsieur BENCHARIF Djemil..... Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes-Atlantique-ONIRIS

Monsieur BERTHO Nicolas..... Chargé de recherche à l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement



<b>Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment</b>		
Responsable : Emmanuel JAFFRES – Adjointe : Frédérique NGUYEN		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr) Marc GOGNY (PR émérite)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (MC) Stagiaire) Martine KAMMERER (PR émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr)	Julie HERVE (Pr) Grégoire MIGNOT (MC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Pierre CORDIER (CERC) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC) Florian CHOCTEAU (MC stagiaire)
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC HDR) Emmanuel JAFFRES (MC HDR)	Mathilde MOSSER (MC) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC) Judith LORANT (MC stagiaire)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	Charlotte MOCQUARD (PRAG) Aurore CALVEL (PRAG)
<b>Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique</b>		
Responsable : Raphaël GUATTEO – Adjoint : Jean-Michel CAPPELIER		
Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ (Pr) Aurélien MADOUASSE (MC HDR) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr) Pauline MAISONNASSE (CERC)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC HDR) Léa LOISEL (AERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Raphaël GUATTEO (Pr) Aurore BOISHARDY (CERC) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (CERC) Bruno LE BIZEC (Pr)	Sofia STRUBBIA (MC) Marie-France PILET (Pr)

<b>Département DSC Sciences cliniques</b>		
Responsable : <b>Catherine IBISCH</b> – Adjoint : <b>Marion FUSELLIER</b>		
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (Pr)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Claire DEFOURMESTRAUX (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass) Vincent BRUET (MC)	Sabrina VIEU (AERC) Maria Dolores SANCHEZ (CERC)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (Pr) Catherine IBISCH (MC HDR) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND (Pr)
<b>Département GPA Génie des procédés alimentaires</b>		
Responsable : <b>Vanessa JURY</b> – Adjointe : <b>Cyril TOUBLANC</b>		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (Pr) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
PAC-ING	Cyril Gaillard (PCEA)	
<b>Département MSC Management, statistiques et communication</b>		
Responsable : <b>Samira ROUSSELIERE</b> – Adjointe : <b>Véronique CARIOU</b>		
Mathématiques, statistiques, informatique	Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr) Jean-Michel GALHARRET (MC)	Véronique CARIOU (Pr) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC) Sibylle DUCHAINE (MC) Franck INSGNARES (IE)	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. Cont.)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

## Formations Techniciens supérieurs

Responsable : Laurence FRERET

Laurence FRERET (PCEA) Françoise BRICHET (IAE) Christophe CARON (PLPA) Virginie MAGIN (Ens.cont.)
--

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel,  
 PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole,  
 HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens. Cont. :  
 Enseignant Contractuel



La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénoms de l'auteur : Mangin Julia, Lucie, Sarah
- Année de soutenance : 2024.
- Titre de la thèse : Risque de transmission par le chien mâle de l'herpèsvirus canin (CHV-1) : étude du pouvoir infectieux du sperme et mise en évidence de son effet inhibiteur sur le PCR.
- Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes.
- Ecole de soutenance : Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation Nantes Atlantique
- Nombre de pages : 160 p.

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>- 7 -</b>
<b>TABLE DES ANNEXES</b> .....	<b>- 11 -</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	<b>- 12 -</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	<b>- 14 -</b>
<b>TABLE DES ABREVIATIONS ET SIGLES</b> .....	<b>- 15 -</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>- 18 -</b>
<b>PREMIERE PARTIE : L'HERPESVIROSE CANINE</b> .....	<b>- 19 -</b>
1.1) DEFINITION ET HISTOIRE .....	- 19 -
1.2) REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET IMPORTANCE.....	- 19 -
1.2.1) Répartition géographique .....	- 19 -
1.2.2) Importance .....	- 19 -
1.3) ETIOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE ET PATHOGENIE.....	- 20 -
1.3.1) Description du virus .....	- 20 -
1.3.2) Epidémiologie .....	- 21 -
1.3.2.1) Epidémiologie descriptive .....	- 21 -
1.3.2.1.1) Espèce cible.....	- 21 -
1.3.2.1.2) Sources .....	- 22 -
1.3.2.1.3) Mode de transmission .....	- 22 -
1.3.2.2) Epidémiologie analytique .....	- 23 -
1.3.3) Pathogénie et étude clinique .....	- 23 -
1.3.3.1) Infection chez le chiot de moins de 3 semaines.....	- 23 -
1.3.3.2) Infection chez le chien et le chiot de plus de 3 semaines.....	- 24 -
1.3.3.3) Facteurs influençant la pathogénie.....	- 24 -
1.3.3.4) Pouvoir immunogène .....	- 24 -
1.4) ETUDE CLINIQUE .....	- 25 -
1.4.1) Forme systémique chez le chiot de moins de 3 semaines .....	- 25 -
1.4.2) Forme respiratoire .....	- 25 -
1.4.3) Forme génitale et troubles de la reproduction .....	- 26 -
1.4.4) Forme oculaire .....	- 26 -
1.4.5) Lésions .....	- 26 -
1.5) DIAGNOSTIC .....	- 27 -
1.5.1) Diagnostics épидémiо-clinique et post-mortem .....	- 27 -
1.5.2) Diagnostic expérimental .....	- 27 -
1.5.4) Diagnostic différentiel .....	- 28 -
1.6) TRAITEMENT .....	- 28 -

1.7) PROPHYLAXIE.....	- 29 -
1.7.1) <i>Prophylaxie sanitaire</i> .....	- 29 -
1.7.2) <i>Prophylaxie médicale</i> .....	- 29 -
1.8) LATENCE.....	- 29 -
1.8.1) <i>Entrée en latence</i> .....	- 29 -
1.8.2) <i>Phase de latence</i> .....	- 30 -
1.8.3) <i>Réactivation et sortie de latence</i> .....	- 30 -
<b>DEUXIEME PARTIE : PRODUCTION DU SPERME, INTERACTION SPERME-VIRUS (HERPES) ET DETECTION DE CES</b>	
<b>DERNIERS .....</b>	<b>- 31 -</b>
2.1) PRODUCTION DE SPERME CHEZ LE CHIEN .....	- 31 -
2.1.1) <i>Rappels anatomiques de l'appareil génital du chien mâle (Barone 1978)</i> .....	- 31 -
2.1.1.1) Testicule et voies spermatiques .....	- 31 -
2.1.1.2) Pénis .....	- 34 -
2.1.1.3) Glandes annexes.....	- 35 -
2.1.1.3.1) Prostate .....	- 35 -
2.1.1.3.2) Glandes préputiales .....	- 36 -
2.1.2) <i>De la production à l'émission du sperme</i> .....	- 37 -
2.1.2.1) Tube séminifère : unité de production des spermatozoïdes .....	- 37 -
2.1.2.2) Spermatogenèse.....	- 38 -
2.1.2.2.1) Spermatocytogenèse .....	- 38 -
2.1.2.2.2) Spermiogénèse.....	- 38 -
2.1.2.2.3) Spermiation .....	- 38 -
2.1.2.2.4) Les conditions nécessaires à la spermatogenèse .....	- 39 -
2.1.2.3) Ejaculation.....	- 40 -
2.1.2.4) Composition du sperme .....	- 40 -
2.2) INTERACTIONS SPERME-VIRUS.....	- 43 -
2.2.1) <i>Transmission vénérienne d'herpèsvirus via le sperme</i> .....	- 43 -
2.2.1.1) Chez l'homme .....	- 43 -
2.2.1.2) Chez le bovin.....	- 46 -
2.2.1.3) Chez le porc.....	- 47 -
2.2.1.4) Chez les équidés.....	- 48 -
2.2.2) <i>Immunité associée à la production et l'émission du sperme</i> .....	- 49 -
2.2.2.1) Rappels sur l'immunité, en particulier l'immunité antivirale .....	- 49 -
2.2.2.1.1) Immunité innée.....	- 49 -
2.2.2.1.2) Immunité adaptative.....	- 50 -
2.2.2.2) Immunité de l'appareil génital mâle .....	- 51 -
2.2.2.2.1) Immunité du testicule .....	- 51 -
2.2.2.2.1.1) Barrière hémato-testiculaire .....	- 52 -
2.2.2.2.1.2) Système immunitaire du testicule.....	- 53 -
2.2.2.2.2) Immunité des voies spermatiques et de la prostate (pour revue Hedger 2015) .....	- 54 -

2.2.3) Modulation des infections virales par le sperme .....	- 56 -
2.2.3.1) Inhibition des infections virales par le sperme .....	- 57 -
2.2.3.2) Stimulation des infections virales par le sperme .....	- 58 -
2.3) OUTILS DE RECHERCHE DE VIRUS DANS LE SPERME : AVANTAGES ET LIMITES .....	- 60 -
2.3.1) Techniques de mise en évidence de virions et protéines virales .....	- 60 -
2.3.1.1) Isolement viral .....	- 60 -
2.3.1.2) Immunofluorescence directe et indirecte.....	- 61 -
2.3.1.3) Microscopie électronique.....	- 61 -
2.3.2) Techniques de détection des acides nucléiques viraux .....	- 63 -
2.3.2.1) Analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) des herpes virus .....	- 63 -
2.3.2.2) PCR.....	- 63 -
2.3.2.2.1) Principe de la PCR .....	- 63 -
2.3.2.2.2) Risque d'inhibition de la PCR par le sperme .....	- 66 -
2.3.2.3) Technique d'amplification isotherme médiée par boucle .....	- 70 -
2.3.2.4) Hybridation in situ.....	- 71 -
2.3.1.5) Techniques haut-débit multiples.....	- 71 -

**TROISIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE..... - 74 -**

OBJECTIFS.....	- 74 -
3.1) MATERIEL ET METHODE.....	- 74 -
3.1.1) Obtention et utilisation du sperme canin .....	- 74 -
3.1.1.1) Prélèvement de sperme frais .....	- 74 -
3.1.1.2) Préparation du liquide spermatique acellulaire (LSA) et des culots cellulaires de la phase spermatique .....	- 75 -
3.1.2) Cultures cellulaires.....	- 75 -
3.1.2.1) Culture de la lignée cellulaire MDCK.....	- 75 -
3.1.2.2) Amplification de la souche virale DK13 sur cellules MDCK.....	- 77 -
3.1.2.3) Culture des spermatozoïdes.....	- 79 -
3.1.3) Recherche d'un possible effet virucide du sperme .....	- 79 -
3.1.4) Etude de la capacité des spermatozoïdes à transmettre le virus après lavages .....	- 85 -
3.1.5) Evaluation d'un possible risque d'inhibition de la PCR par le liquide spermatique acellulaire (LSA) .....	- 91 -
3.1.5.1) Réalisation d'une gamme de dilutions d'ADN de cellules MDCK infectées par DK13.....	- 91 -
3.1.5.2) Evaluation de la sensibilité de la PCR en eau.....	- 92 -
3.1.5.3) Analyses préliminaires d'une possible inhibition de la PCR par le LSA.....	- 92 -
3.1.5.4) Analyse d'une possible inhibition de la PCR par le LSA et variabilité interindividuelle .....	- 93 -
3.1.6) Extractions d'ADN des échantillons.....	- 93 -
3.1.6.1) Principe général.....	- 93 -
3.1.6.2) Protocoles différents utilisés selon le type de prélèvement.....	- 93 -
3.1.6.2.1) Extraction à partir de culots cellulaires.....	- 93 -
3.1.6.2.2) Extraction à partir de sumageants acellulaires .....	- 94 -
3.1.6.3) Mesure de la concentration en ADN des échantillons et de leur qualité .....	- 94 -
3.1.7) Recherche d'ADN viral par PCR en temps réel EvaGreen® .....	- 95 -

3.2) RESULTATS .....	- 100 -
3.2.1) <i>Etude de la capacité des spermatozoïdes à transmettre le virus (après lavage)</i> .....	- 100 -
3.2.1.1) Mesure de la mobilité et du pourcentage de spermatozoïdes progressifs .....	- 100 -
3.2.1.2) Observation des tapis cellulaires et recherche d'effet cytopathique .....	- 101 -
3.2.1.3) Mesure de la concentration en ADN des culots et de leur qualité .....	- 101 -
3.2.1.4) PCR EvaGreen® .....	- 102 -
3.2.1.4.1) Analyse des surnageants de lavage des culots de spermatozoïdes .....	- 102 -
3.2.1.4.2) Analyse des culots de spermatozoïdes .....	- 105 -
3.2.1.4.3) Analyse des culots de cellules MDCK.....	- 106 -
3.2.1.4.4) Analyse des surnageants de culture des cellules MDCK.....	- 107 -
3.2.2) <i>Recherche d'un possible effet virucide du sperme</i> .....	- 109 -
3.2.2.1) Observation des tapis cellulaires et recherche d'un effet cytopathique.....	- 109 -
3.2.2.2) Mesure de la concentration en ADN des culots et de leur qualité .....	- 110 -
3.2.2.3) PCR EvaGreen® .....	- 111 -
3.2.2.3.1) Analyse des culots de cellules MDCK.....	- 111 -
3.2.2.3.2) Analyse des surnageants.....	- 111 -
3.2.3) <i>Evaluation d'un possible risque d'inhibition de la PCR par le liquide spermatique acellulaire (LSA)</i> .....	- 113 -
3.2.3.1) Evaluation de la sensibilité de la PCR en eau.....	- 113 -
3.2.3.2) Analyses préliminaires d'une possible inhibition de la PCR par le LSA.....	- 113 -
3.2.3.3) Analyse d'une possible inhibition de la PCR par le LSA et variabilité interindividuelle.....	- 114 -
3.3) DISCUSSION.....	- 117 -
3.3.1) <i>Etude de la capacité des spermatozoïdes à transmettre le virus après lavage</i> .....	- 117 -
3.3.2) <i>Recherche d'un possible effet virucide du sperme</i> .....	- 120 -
3.3.3) <i>Evaluation d'un possible risque d'inhibition de la PCR par le liquide spermatique acellulaire (LSA)</i> .....	- 122 -
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>- 126 -</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>- 127 -</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>- 146 -</b>

## TABLE DES ANNEXES

<i>Annexe 1 : MO-6 - Culture cellulaire : lignée MDCK .....</i>	<i>- 146 -</i>
<i>Annexe 2 : MO-10 - Amplification CHV sur lignée canine MDCK.....</i>	<i>- 147 -</i>
<i>Annexe 3 : MO-15 - Test d'un possible effet « virucide ».....</i>	<i>- 148 -</i>
<i>Annexe 4 : MO-15 - Test d'un possible effet « virucide » avec Trypsine .....</i>	<i>- 149 -</i>
<i>Annexe 5 : MO-15 - Test d'infection des spermatozoïdes .....</i>	<i>- 150 -</i>
<i>Annexe 6 : MO-2 – Extraction d'ADN total à partir de culots de cellules MDCK .....</i>	<i>- 152 -</i>
<i>Annexe 7 : MO-5 – Extraction d'ADN viral à partir de liquide biologique .....</i>	<i>- 153 -</i>
<i>Annexe 8 : MO-8 – Procédure q-PCR EvaGreen de chez SolisBiodyne .....</i>	<i>- 154 -</i>

## TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Arbre phylogénétique des ADN polymérase des Varicellovirus. L'arbre est basé sur HSV1, qui est un membre du genre Simplexvirus. (Papageorgiou et al. 2016)</i>	- 20 -
<i>Figure 2 : Représentation schématique du virus CHV (Charles et al. 2022)</i>	- 21 -
<i>Figure 3 : Coupe longitudinale de l'appareil génital du chien mâle (réalisation personnelle, d'après Hermanson et al, 2020)</i>	- 31 -
<i>Figure 4 : Coupe longitudinale et coupe transversale du testicule et de ses enveloppes en passant par la région inguinale (réalisation personnelle, d'après Christopher-Hennings et al. 2008)</i>	- 32 -
<i>Figure 5 : Coupe longitudinale d'un testicule (réalisation personnelle, d'après Constantinescu 2007)</i>	- 33 -
<i>Figure 6 : Schéma des structures pelviennes et coupe longitudinale du pénis (réalisation personnelle, d'après L. Buchholz, DVM Class of 1994, (Hermanson, De Lahunta, Evans 2020)</i>	- 35 -
<i>Figure 7 : Structure d'un tube séminifère contourné (réalisation personnelle, d'après Barone 1978)</i>	- 37 -
<i>Figure 8 : Schéma d'un spermatozoïde (réalisation personnelle, d'après Sirivaidyapong 2000)</i>	- 39 -
<i>Figure 9 : Compartimentation immunologique du testicule (réalisation personnelle, d'après Hedger 2015)</i>	- 52 -
<i>Figure 10 : effet cytopathique du CHV-1 sur un tapis de cellules MDCK</i>	- 61 -
<i>Figure 11 : Virions du CHV-1 observés au microscope électronique (Strandberg, Carmichael 1965)</i>	- 62 -
<i>Figure 12 : Principe de la ddPCR (Chen et al. 2021)</i>	- 65 -
<i>Figure 13 : Principe de la méthode LAMP (Hansen, Abd El Wahed 2020)</i>	- 70 -
<i>Figure 14 : Amplification du virus (souche DK13) sur cellules MDCK (réalisé avec Biorender.com)</i>	- 78 -
<i>Figure 15 : Préparation du liquide spermatique a cellulaire (réalisé sur Biorender.com)</i>	- 80 -
<i>Figure 16 : Préparation des dilutions virales (réalisé sur Biorender.com)</i>	- 80 -
<i>Figure 17 : Préparation des solutions d'incubations (réalisé sur Briorender.com)</i>	- 81 -
<i>Figure 18 : Incubation sur les tapis cellulaires MDCK (réalisé sur Biorender.com)</i>	- 82 -
<i>Figure 19 : Surveillance et arrêt de l'incubation (réalisé sur Biorender.com)</i>	- 84 -
<i>Figure 20 : Infection des spermatozoïdes (réalisé sur Biorender.com)</i>	- 86 -
<i>Figure 21 : Lavage des culots (réalisé avec Biorender.com)</i>	- 87 -
<i>Figure 22 : Schéma de la plaque 12 puits avec nacelles</i>	- 87 -
<i>Figure 23 : Passage des spermatozoïdes sur tapis cellulaire MDCK (réalisé sur Biorender.com)</i>	- 88 -
<i>Figure 24 : Retrait des nacelles (réalisé avec Biorender.com)</i>	- 89 -
<i>Figure 25 : Arrêt de la possible amplification virale (réalisé sur Biorender.com)</i>	- 90 -
<i>Figure 26 : Principe de la PCR classique (réalisé sur Biorender.com)</i>	- 96 -
<i>Figure 27 : Principe de la PCR en temps réel EvaGreen® (réalisé avec Biorender.com)</i>	- 99 -
<i>Figure 28 : Effet cytopathique du CHV-1 observé sur les tapis de cellules MDCK</i>	- 101 -
<i>Figure 29 : Tapis cellulaires des flasques F2, F3 et F4 de V1 lors de l'arrêt de l'amplification au microscope optique.</i>	- 109 -

*Figure 30 : Tapis cellulaires des flasques F1 et F2 de V2 lors de l'arrêt de l'amplification au microscope optique. A gauche : F1 (témoin négatif), le tapis cellulaire est à confluence. A droite : F2 (témoin positif), effet cytopathique du virus sur le tapis cellulaire.* \_\_\_\_\_ - 110 -



## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Recensement des espèces exposées au CHV par détection d'anticorps dirigés contre ce virus (Charles et al. 2022)	- 22 -
Tableau 2 : Diagnostic différentiel des avortements et de la mortalité néonatale (Poulet 2005).	- 28 -
Tableau 3 : concentrations biochimiques dans les trois fractions de 20 éjaculats canins (England, Allen, Middleton 1990)	- 41 -
Tableau 4 : Concentration des échantillons de la gamme « mère » de dilutions d'ADN de cellules MDCK infectées par DK13	- 91 -
Tableau 5 : Concentration des échantillons de la gamme fille en eau	- 92 -
Tableau 6 : Dilutions des liquides spermatiques cellulaires et leur mélange avec les échantillons de la gamme mère.	- 92 -
Tableau 7 : Mesure de la mobilité et du pourcentage de spermatozoïdes progressifs avant et après incubation en présence ou absence du virus, à l'aide d'un analyseur de semence IVOS (système CASA) ; comparaison de la mobilité et du % de progressifs avant et après incubation.	- 100 -
Tableau 8 : Qualité et concentration en ADN des extractions pour les culots de spermatozoïdes et les culots de cellules MDCK, mesurées au spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 / 2000c (Thermo Scientific™)	- 102 -
Tableau 9 : Nombre de cycle seuil (Cq) en triplicata et température de fusion (Tm) pour les surnageant et lavages des culots de spermatozoïdes. Mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™).	- 104 -
Tableau 10 : Nombre de cycle seuil (Cq) en triplicata et température de fusion (Tm) pour les culots de spermatozoïdes. Mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™).	- 105 -
Tableau 11 : Nombre de cycle seuil (Cq) en triplicata et température de fusion (Tm) pour les culots de cellules MDCK. Mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™).	- 106 -
Tableau 12 : Nombre de cycle seuil (Cq) en triplicata et température de fusion (Tm) pour les surnageants de culture des cellules MDCK. Mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™).	- 108 -
Tableau 13 : Qualité et concentration en ADN des extractions pour les culots de cellules MDCK de V1, V2 et V3. Mesurées au spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 / 2000c (Thermo Scientific™)	- 110 -
Tableau 14 : Nombre de cycle seuil (Cq) en triplicata et température de fusion (Tm) pour les culots de cellules MDCK. Mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™).	- 111 -
Tableau 15 : Nombre de cycle seuil (Cq) en triplicata et température de fusion (Tm) pour les surnageants de V2. Mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™).	- 112 -
Tableau 16 : Nombre de cycle seuil (Cq) moyen pour les dilutions D0 à D6 en eau, mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™)	- 113 -
Tableau 17 : Nombre de cycle seuil (Cq) moyen pour les dilutions D <sub>0</sub> à D <sub>4</sub> mélangées au ½ avec des LSA dilué au 1/5 <sup>ème</sup> , 1/20 <sup>ème</sup> , 1/40 <sup>ème</sup> et 1/100 <sup>ème</sup> , mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™)	- 113 -
Tableau 18 : Nombre de cycle seuil (Cq) moyen pour les dilutions D <sub>0</sub> , D <sub>2</sub> et D <sub>4</sub> mélangées au ½ avec des LSA dilué au 1/50 <sup>ème</sup> , 1/200 <sup>ème</sup> et 1/500 <sup>ème</sup> , mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™)	- 115 -

## TABLE DES ABREVIATIONS ET SIGLES

μcLAMP	Micro Loop-mediated Isothermal Amplification
A260	Absorbance à 260 nm
A280	Absorbance à 280 nm
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALAT	Alanine AminoTransférase
ARN	Acide RiboNucléique
ASAT	Aspartate AminoTransférase
BoHV-1	Herpèsvirus Bovin de type 1
BoHV-4	Herpèsvirus Bovin de type 4
BoHV-5	Herpèsvirus Bovin de type 5
CHV/CHV-1	Herpèsvirus Canin de type 1
Cq	Cycle seuil (Quantification cycle)
ddPCR	Digital Droplet PCR
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEMc	Dulbecco's Modified Eagle Medium complémenté
DMSO	DiMéthylSulfOxide
EBV	Virus Epstein-Barr
EHV-1	Herpèsvirus équin de type 1
EHV-3	Herpèsvirus équin de type 3
EHV-4	Herpèsvirus équin de type 4
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FHV-1	Herpèsvirus félin de type 1
FISH	Hybridation In Situ en Fluorescence
FSH	Hormone de Stimulation Folliculaire
HCMV	Cytomégalovirus Humain
HCV	Virus de l'Hépatite C
HHV-6	Herpèsvirus Humain de type 6
HHV-6A	Herpèsvirus Humain de type 6A
HHV-6B	Herpèsvirus Humain de type 6B
HHV-7	Herpèsvirus Humain de type 7

HHV-8	Herpèsvirus Humain de type 8
HSV-1	Herpèsvirus Simplex de type 1
HSV-2	Herpèsvirus Simplex de type 2
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IPMA	Immunoperoxidase en monocouche
ISH	Hybridation In Situ
KSHV	Virus associé au sarcome de Kaposi
LAMP	Amplification Isotherme médiée par boucle
LH	Hormone Lutéinisante
LSA	Liquide Spermatique Acellulaire
MALT	Tissu lymphoïde associé aux muqueuses
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
ME	Microscope électronique
MO	Mode Opérateur
NGS	Séquençage Nouvelle Génération
NK	Natural Killer
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
PAP	Phosphatase Acide Prostatique
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne
pH	Potentiel Hydrogène
PRV	Virus de la pseudorage ou de la maladie d'Aujeszky
RFLP	Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction
RFU	Unités de Fluorescence Relative
RT	Rétro-Transcription
SEVI	Semen-Derived Enhancer of Virus Infection
SI	Système Immunitaire
SNG	Surnageant
SVF	Sérum de Veau Foetal

TA	Température ambiante
TCID50	50% Tissue Culture Infectious Dose
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
T-reg	Lymphocyte T-régulateur
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VZV	Virus de la Varicelle et de Zona
ZIKV	Virus Zika

# INTRODUCTION

L'herpèsvirose canine est une maladie causée par l'herpèsvirus canin de type 1 (CHV-1). C'est un virus à ADN bicaténaire enveloppé, de la famille des *herpesviridae*, découvert en 1965. Cette maladie est responsable d'une atteinte clinique faible à modérée chez l'adulte, pouvant entraîner des troubles de la reproduction. A l'inverse, elle peut s'avérer mortelle chez le chiot de moins de trois semaines. La transmission de ce virus se fait principalement par contact direct, par voie oro-nasale mais aussi par voie vénérienne. Les mécanismes de cette dernière sont moins connus, et il est important de les explorer afin de pouvoir limiter la transmission du CHV-1 lors de la reproduction. De plus, le CHV-1 ayant la capacité d'entrer en latence, un animal infecté ne présentera pas nécessairement de signes cliniques, ce qui complique son diagnostic.

De précédentes études au sein de l'école vétérinaire de Nantes ont permis de mettre en évidence pour la première fois de l'ADN du CHV-1 dans le sperme du chien (Charles et al. 2022). Cette découverte ouvre la porte à de nouvelles recherches dont le but serait de définir si le sperme de chien peut être considéré comme une matière virulente et s'il est ainsi capable d'infecter une femelle lors d'une saillie ou d'une insémination artificielle. Le sperme a déjà été identifié comme matière virulente dans le cas d'infection par des herpesvirus dans d'autres espèces, comme par exemple BoHV-1 chez le bovin (van Oirschot 1995) ou chez l'homme avec le HCMV (Gimenes et al. 2014).

Cette étude a comme objectif de caractériser le risque de transmission du CHV-1 par le chien mâle lors de la reproduction. Le premier objectif est d'évaluer la capacité des spermatozoïdes à transmettre le virus (en particulier après lavages). Nous évaluerons également le potentiel virucide du sperme en conditions *in vitro*. Nous utiliserons pour cela des techniques de réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Une attention particulière sera portée au risque de faux négatifs dus à la présence d'inhibiteurs dans le sperme, comme déjà décrit dans d'autres espèces (Bourlet et al. 2003; Wang et al. 2007).

Cette thèse expérimentale vétérinaire est divisée en trois parties. La première est une synthèse bibliographique des connaissances actuelles sur l'herpèsvirose canine. La seconde partie, qui est aussi bibliographique, décrit les mécanismes de transmission de virus par le sperme et fait état des connaissances sur ses propriétés potentiellement virucides. Enfin la troisième est la partie expérimentale.

# PREMIERE PARTIE : L'HERPESVIROSE CANINE

L'objectif de cette première partie est de faire une synthèse des connaissances actuelles sur l'herpès-virose canine.

## **1.1) DEFINITION ET HISTOIRE**

C'est en 1965, au cours d'une étude sur une maladie mortelle touchant des chiots nouveau-nés que l'Herpèsvirus canin de type 1 (CHV-1) a été décrit pour la première fois par Carmichael (Carmichael, Squire, Krook 1965). Après avoir écarté les mycoplasmes comme agents responsables, une souche virale possédant les caractéristiques d'un Herpèsvirus a été découverte (Carmichael, Strandberg, Barnes 1965; Spertzel et al. 1965).

## **1.2) REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET IMPORTANCE**

### ***1.2.1) REPARTITION GEOGRAPHIQUE***

Le CHV-1 est réparti dans le monde entier : Amérique du Nord et du Sud (Carmichael, Strandberg, Barnes 1965; Monteiro et al. 2016; Castro et al. 2021), Australie (Geldard, Geering, Bagust 1971; Sarker et al. 2018), Nouvelle-Zélande (More et al. 2021), Afrique (Bartsch, Hubschle, Els 1974; Nöthling et al. 2008) Asie (Xuan et al. 1990; Seo, Seong, Lim 1994; Yeşilbağ et al. 2012; Matsuu et al. 2020; Rezaei et al. 2020; 2023), ainsi qu'en Europe où il a été mis en évidence pour la première fois en Allemagne en 1975 (Bibrack, Schaudinn 1976), puis dans les Pays-Bas, la France, la Belgique, le Royaume-Unis, la Norvège, la Finlande, l'Italie et la Slovaquie (Milleret et al. 2022)

### ***1.2.2) IMPORTANCE***

L'importance du CHV-1 dans l'élevage et la santé canine tient notamment à la mortalité néonatale chez les chiots de moins de 3 semaines et aux troubles de la reproduction qu'il induit. Il a donc un impact psychologique et financier non négligeable pour les éleveurs.

## 1.3) ETIOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE ET PATHOGENIE

### 1.3.1) DESCRIPTION DU VIRUS

Le CHV-1 fait partie de l'ordre des *Herpesviridae*, de la sous-famille des *alpha-herpesviridae* et du genre *Varicellovirus* (voir Figure 1). Seulement deux clades ont été découverts à ce jour, mettant en avant la grande conservation et stabilité du virus (Lewin et al. 2020).

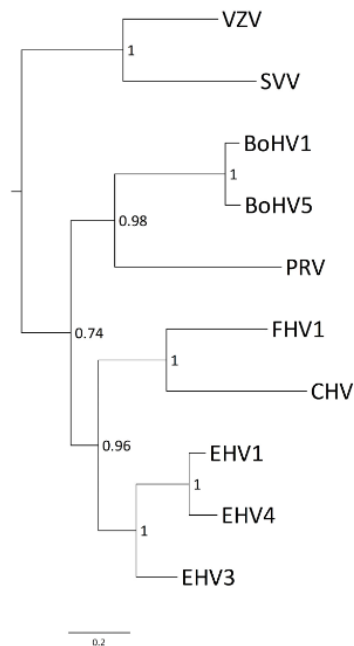
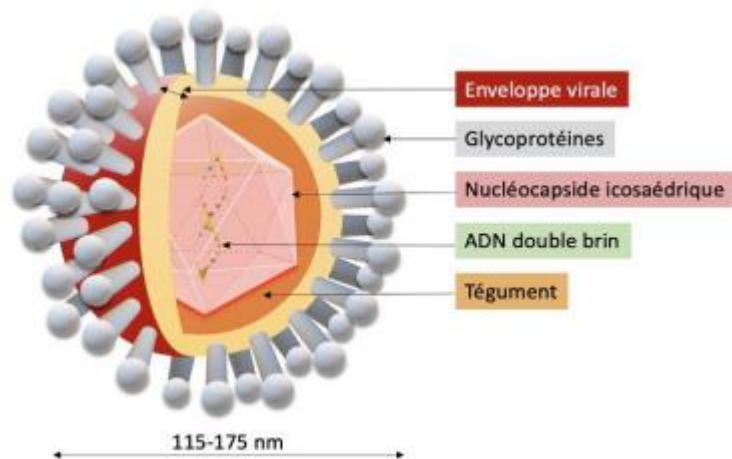


Figure 1 : Arbre phylogénétique des ADN polymérase des Varicellovirus. L'arbre est basé sur HSV1, qui est un membre du genre Simplexvirus. Les valeurs Bootstrap sont indiquées aux nœuds sous forme de fraction. La barre d'échelle indique les substitutions par résidus d'acide aminé (Papageorgiou et al. 2016)

Le CHV-1 est un virus enveloppé à ADN bicaténaire. Il mesure entre 115 et 175 nm de diamètre et est composé d'une nucléocapside icosaédrique de 162 capsomères contenant l'ADN, d'un tégument majoritairement protéique (Strandberg, Carmichael 1965). Son enveloppe est caractérisée par une bicouche phospholipidique contenant différentes protéines membranaires et des glycoprotéines, dont certaines sont majeures dans l'immunité contre le CHV-1 (voir Figure 2).



*Figure 2 : Représentation schématique du virus CHV (Charles et al. 2022; Poulet 2005; Papageorgiou et al. 2016)*

En ce qui concerne son génome, sa taille est estimée à 125 kpb et son organisation est classique de celle des Varicellovirus (Papageorgiou et al. 2016). De plus, ce virus est monotypique, aucune variation antigénique n'a pu être mise en évidence parmi les 16 souches isolées à travers le monde (Decaro, Martella, Buonavoglia 2008).

Le mécanisme exact d'entrée du CHV-1 dans les cellules n'est pas encore connu. L'attachement aux cellules débute par une interaction entre les groupements heparan sulfate des protéoglycanes de la membrane cellulaire et la glycoprotéine C, comme c'est le cas pour les autres alphaherpesvirus (Poulet 2005). Une étude récente a montré que la pénétration du virus dans des cellules épithéliales se faisait par un mécanisme proche de la macropinocytose, indépendant du pH (Eisa et al. 2021). Une seconde étude a montré que le virus est capable d'infecter des cellules polarisées préférentiellement par le pôle basal mais également par le pôle apical (Eisa, Micky, Pearson 2022). Néanmoins ces recherches n'excluent pas la présence d'un récepteur spécifique permettant l'entrée du virus dans la cellule.

## **1.3.2) EPIDEMIOLOGIE**

### **1.3.2.1) Epidémiologie descriptive**

#### *1.3.2.1.1) Espèce cible*

Le CHV-1 est spécifique de l'espèce canine, qui constitue donc l'espèce cible principale. Des anticorps anti-CHV-1 ont néanmoins pu être identifiés chez d'autres espèces de canidés (Decaro,



Martella, Buonavoglia 2008) mais également chez la loutre de rivière (*Lontra canadensis*) aux Etats-Unis (Kimber, Kollias, Dubovi 2000).

Tableau 1 : Recensement des espèces exposées au CHV par détection d'anticorps dirigés contre ce virus (Charles et al. 2022)

<b>Espèce</b>	<b>Pays</b>	<b>Référence et année de publication</b>
<b>Coyote (<i>Canis latrans</i>)</b>	États-Unis d'Amérique	Evermann et al. 1984
		Davidson et al. 1992
<b>Renard roux (<i>Vulpes vulpes</i>)</b>	États-Unis d'Amérique	Davidson et al. 1992
	Allemagne	Truyen et al. 1998
	Australie	Robinson et al. 2005
<b>Loutre de rivière (<i>Lontra canadensis</i>)</b>	États-Unis d'Amérique	Kimber, Kollias, Dubovi 2000
<b>Chacal (<i>Canis mesomelas</i>)</b>	Namibie	Gowtage-Sequeira 2004
<b>Loup gris (<i>Canis lupus</i>)</b>	États-Unis d'Amérique	Almberg et al. 2009
		Watts, Benson 2016

#### 1.3.2.1.2) Sources

Le principal réservoir du CHV-1 est constitué des chiens porteurs sains, qui suite à une infection ont vu le virus entrer en latence. Les sources sont alors soit ces mêmes chiens suite à une réactivation du virus ou les chiens primo-infectés.

#### 1.3.2.1.3) Mode de transmission

Le chien adulte se contamine principalement par contact direct, majoritairement par voie oro-nasale via les sécrétions salivaires et respiratoires (Appel et al. 1969). La contamination peut aussi se faire par voie vénérienne (Poste, King 1971) via les sécrétions génitales, qu'elles soient

physiologiques ou pathologiques, le virus ayant été mis en évidence sur des écouvillons vaginaux (Ronsse et al. 2002; 2004). Les produits d'avortement seraient également des matières virulentes (Hashimoto et al. 1982; 1983). La question de la virulence du sperme se pose depuis qu'il y a été mis en évidence (Charles et al. 2022). Enfin les sécrétions oculaires pourraient être des matières virulentes, dans le cas d'une atteinte clinique oculaire (Ledbetter, Kim, et al. 2009).

Chez le chiot la contamination peut être horizontale, de la même façon que l'adulte, et ce dès la naissance au contact de la mère ou lors de la mise-bas via les sécrétions vaginales mais aussi contact d'autres animaux excréteurs (Appel et al. 1969; Cornwell, Wright 1969). L'infection peut aussi être verticale, *in utero* par voie transplacentaire (Stewart et al. 1965; Hashimoto et al. 1979; 1982; 1983; Ronsse et al. 2002; Krogenæs et al. 2014). Le virus a été isolé dans les fèces des chiots, ce qui en fait potentiellement des matières également virulentes (Losurdo et al. 2018).

### **1.3.2.2) Epidémiologie analytique**

L'âge de l'animal, la parité des chiennes, l'influence des précédents accouplements, le logement, le nombre d'animaux au sein de la collectivité, et le cycle sexuel, sont des facteurs qui ont été étudiés afin de connaître leur influence sur l'infection par le CHV-1, sans qu'un consensus n'ait pu être trouvé.

Plusieurs études ont montré qu'il n'y aurait pas d'influence du sexe ou de la participation aux événements collectifs sur l'infection par le CHV-1, mais la fréquence de participation n'y a pas été étudiée (Ronsse et al. 2004; Krogenæs et al. 2012; 2014).

Une étude a trouvé que les conditions d'hygiène du logement seraient un facteur de risque dans le cadre de la propagation du virus (Ronsse et al. 2004).

## **1.3.3) PATHOGENIE ET ETUDE CLINIQUE**

### **1.3.3.1) Infection chez le chiot de moins de 3 semaines**

Le CHV-1 est capable de passer du placenta de la mère au fœtus (Hashimoto et al. 1983), mais la pathogénie exacte de ce passage n'a pas encore été étudiée. Le virus a été détecté dans le placenta de chiennes infectées (Hashimoto et al. 1982).

Lors d'infection par voie oro-nasale le virus se réplique au niveau des muqueuses nasopharyngées, des amygdales, des glandes salivaires et des nœuds lymphatiques rétro-

pharyngiens et bronchiques notamment (Burr et al. 1996; Miyoshi et al. 1999; Losurdo et al. 2018).

Après cette première phase infectieuse a lieu un épisode de virémie, permis par les lymphocytes et les monocytes infectés par le virus (Wright et al. 1970; Poulet 2005). Le virus est alors retrouvé dans de nombreux organes : reins, poumons, rate, cœur, foie, mais aussi le système nerveux central (Huxsoll, Hemelt 1970; Jager et al. 2017).

#### **1.3.3.2) Infection chez le chien et le chiot de plus de 3 semaines**

L'infection par voie oro-nasale chez les chiens plus âgés se déroulent dans un premier temps de la même façon que chez le chiot de moins de 3 semaines : réplication au sein de la sphère oro-pharyngée et des nœuds lymphatiques puis épisode de virémie permis par les lymphocytes et monocytes infectés. Après un épisode clinique, le virus rentre en latence (cf paragraphe 1.7).

L'infection par voie vénérienne est également possible à partir de la maturité sexuelle. Le virus peut se multiplier au sein des muqueuses vaginales, du pénis et du prépuce (Hill, Maré 1974) et serait capable d'entrer en latence au niveau des nœuds lymphatiques lombo-sacrés (Miyoshi et al. 1999).

Enfin la contamination par voie oculaire est envisagée, avec comme lieu de réplication primaire du virus le sac conjonctival (Carmichael 1970; Ledbetter, Kim, et al. 2009).

#### **1.3.3.3) Facteurs influençant la pathogénie**

La température optimale de développement du virus est située entre 35 et 37°C (Carmichael, Barnes 1969; Xuan et al. 1990), ce qui peut être mis en corrélation avec la plus grande sensibilité des chiots de moins de trois semaines et l'hypothermie. En effet la thermorégulation est absente chez le chiot dans les 48 à 72 premières heures de vie et complète au bout de 18 jours (Reyes-Sotelo et al. 2021), ce ceux-ci sont donc plus facilement hypothermes, avec une température se rapprochant de la température optimale de développement du virus.

#### **1.3.3.4) Pouvoir immunogène**

Lors d'une primo-infection les anticorps anti-CHV apparaissent à partir de 7 jours, leur concentration étant maximale vers 21 jours post-infection (Ledbetter, Dubovi, et al. 2009). Lors

d'une réactivation du virus suite à un épisode de latence, cette concentration est atteinte au bout de 14 jours environ (Ledbetter, Kim, et al. 2009). Les anticorps persistent environ 8 mois (Ledbetter, Hornbuckle, Dubovi 2009). Les glycoprotéines à l'origine de cette réponse immunitaire sont les produits des gènes gB, gC et gD (Xuan et al. 1997) et sont les glycoprotéines GP 47, GP 145/112 et GP 80, présentes à la surface de l'enveloppe virale (Xuan et al. 1992).

Dans le cas du chiot de moins de trois semaines, il acquiert ces anticorps grâce à leur passage dans le colostrum et après les tétées. Ceci implique une séroconversion chez la mère, soit consécutive à une infection, soit à une vaccination. La présence de ces anticorps chez le chiot permettrait de diminuer fortement les signes cliniques, sans empêcher totalement la réplication du virus (Carmichael 1970).

## **1.4) ETUDE CLINIQUE**

### ***1.4.1) FORME SYSTEMIQUE CHEZ LE CHIOT DE MOINS DE 3 SEMAINES***

La forme systémique, la plus fréquente, est très souvent mortelle. Les symptômes sont ceux d'une déficience multi-systémique : léthargie, anorexie, signes respiratoires (dyspnée et jetage muco-purulent), atteinte digestive (douleur abdominale sévère, nausées, diarrhée jaune à verdâtre), symptômes de maladie hémorragique (œdème, pétéchies, épistaxis). La mort survient dans les 24 à 48 heures suivant l'apparition des premiers signes cliniques, avec un taux de mortalité pouvant atteindre les 100% (Decaro, Martella, Buonavoglia 2008; Fontbonne 2011; Bottinelli et al. 2016; Drechsler 2020). Chez les survivants, des signes neurologiques peuvent s'ajouter à la suite d'une encéphalomyélite (tremblements, chancèlements, opistotonos, mouvements de pédalage) (Fontbonne 2011; Drechsler 2020).

### ***1.4.2) FORME RESPIRATOIRE***

Cette atteinte est incluse dans le syndrome « toux du chenil ». Elle est caractérisée par une toux sèche et paroxystique associée éventuellement à du jetage nasal et un épiphora séreux (Day et al. 2020). Chez les chiots de 5 à 12 semaines les signes cliniques sont ceux d'une rhinite, d'une pharyngite ou d'une trachéobronchite (Evermann, Ledbetter, Maes 2011) mais on trouve également des rhinites nécrosantes et des pneumonies broncho-interstitielles (Thompson, Wright, Cornwell 1972).

Le CHV-1 est rarement seul dans ce syndrome. Il a néanmoins été identifié seul dans quelques cas de détresse respiratoire d'apparition aiguë menant à la mort de l'animal atteint (Kumar et al. 2015).

### **1.4.3) FORME GENITALE ET TROUBLES DE LA REPRODUCTION**

Les signes cliniques sont ceux d'une vulvo-vaginite chez la femelle et d'une balanoposthite chez le mâle associée à des lésions vésiculaires susceptibles de s'ulcérer sur les muqueuses vaginales, préputiales et péniennes (Hill, Maré 1974; Decaro, Martella, Buonavoglia 2008; Bottinelli et al. 2016), qui disparaissent en 1 à 2 semaines (Poste, King 1971; Hill, Maré 1974).

Dans le cas de troubles de la reproduction, la dissémination du virus chez la mère peut mener à une placentite. Les signes cliniques apparaissent principalement dans les 2 derniers tiers de la gestation. Ces signes sont la mort fœtale avec ou non momification, avortement et mortinatalité. Des résorptions embryonnaires sont possibles en début de gestation.

### **1.4.4) FORME OCULAIRE**

La forme oculaire chez l'adulte est caractérisée par une conjonctivite aiguë, évoluant parfois vers une kératite et une ulcération de la cornée, associée éventuellement à un blépharospasme, de la photophobie et un épiphora.

Une atteinte oculaire est possible chez le chiot et se caractérise par des signes de panuvéite, kératite, d'œdème de la cornée, de synéchies ou de cataracte. Si le chiot survit, une dysplasie rétinienne ou une atrophie du nerf optique entraînent souvent une cécité (Evermann, Ledbetter, Maes 2011).

### **1.4.5) LESIONS**

#### **Lésions macroscopiques :**

Les lésions observées sur les différents organes cibles lors de la forme systémique (poumons, reins, rate et foie notamment) sont principalement des lésions nécrotiques et hémorragiques formant des foyers gris-blancs ou rougeâtres de moins de 1 cm de diamètre, donnant un aspect piqueté aux organes touchés (Carmichael, Strandberg, Barnes 1965). Ces mêmes lésions ont été observées au niveau du placenta de chiennes infectées (Hashimoto et al. 1982).

Les lésions observées lors de la forme localisée sont peu spécifiques. On retrouve des vésicules lymphocytaires sur les muqueuses respiratoires ou génitales, qui sont parfois hyperhémisées (Decaro, Martella, Buonavoglia 2008; Drechsler 2020). En cas d'atteinte oculaire une inflammation de la conjonctive et des ulcères cornéens sont également possible (Decaro, Martella, Buonavoglia 2008; Evermann, Ledbetter, Maes 2011).

#### **Lésions microscopiques :**

Les lésions retrouvées sont celles de lésions vasculaires, en effet l'herpèsvirus semble se développer dans l'endothélium occasionnant des foyers hémorragiques et nécrotiques sur les différents organes cibles (Lara et al. 2016). La présence de corps d'inclusions intranucléaires éosinophiles ou basophiles peut être notée dans les cellules entourant ces lésions (Lara et al. 2016).

## **1.5) DIAGNOSTIC**

### ***1.5.1) DIAGNOSTICS EPIDEMIO-CLINIQUE ET POST-MORTEM***

Lors d'atteinte respiratoire, oculaire ou génitale, notamment en élevage, l'herpèsvirose entre dans le diagnostic différentiel, surtout en cas de mortalité ou d'infertilité. Des lésions vésiculeuses à ulcératives peuvent être observées au niveau des muqueuses oculaires ou génitales. Les modifications des paramètres sanguins parfois rencontrées ne sont pas spécifiques (augmentation des ALAT et des ASAT et thrombocytopénie).

Les lésions observées en post-mortem ne sont pas spécifiques de l'herpèsvirose canine, c'est l'association entre les lésions, l'anamnèse et les signes cliniques qui est évocatrice.

### ***1.5.2) DIAGNOSTIC EXPERIMENTAL***

Le diagnostic expérimental est divisé en deux : le diagnostic indirect, avec l'utilisation de la sérologie, et le diagnostic direct, avec la virologie.

La mise en évidence d'anticorps anti-CHV-1 permet d'indiquer si l'animal a déjà été en contact avec le virus, mais ne permet pas de mettre en évidence le virus lui-même. La sérologie ne constitue donc pas un diagnostic de certitude. Pour cela quatre techniques ont été mises au point : la séroneutralisation et l'Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) qui sont les deux les plus utilisées, l'immunofluorescence indirecte et l'immunopéroxydase en monocouche (IPMA) (Charles et al. 2022).

La mise en évidence directe du virus permet d'apporter un diagnostic de certitude. Plusieurs techniques existent : PCR, immunofluorescence directe, culture virale avec effet cytopathogène, hybridation *in situ* et microscopie électronique. En pratique la PCR est la technique la plus utilisée.

#### 1.5.4) DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

Lors d'affection respiratoire le diagnostic différentiel comprend tous les agents pathogènes impliqués dans le syndrome « toux du chenu » (Day et al. 2020). Tandis que dans l'atteinte génitale le diagnostic différentiel oppose le CHV-1 aux balanoposthites et vulvo-vaginites non spécifiques d'origine bactérienne. Dans le cas d'avortement ou de mortinatalité le diagnostic différentiel doit se faire avec l'ensemble des pathologies à l'origine de troubles de la reproduction (Tableau 2).

Tableau 2 : Diagnostic différentiel des avortements et de la mortalité néonatale (Poulet 2005).

	Avortements	Mortalité néonatale
<b>Causes non-infectieuses</b>	Stress, traumatisme Insuffisance lutéale Déficit nutritionnel Origine iatrogène ou toxique Anomalies	Malformations Syndrome du dépérissement du chiot Syndrome du lait toxique Traumatisme Intoxication
<b>Causes infectieuses</b>	<i>Brucella canis</i> <i>Mycoplasma canis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> Bactéries non spécifiques* Parvovirus canin de type 1 (virus minute) <b>Herpesvirus canin de type 1</b> <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Neosporum caninum</i> Infestation parasitaire	<b>Herpesvirus canin de type 1</b> Parvovirus canin de type 1 (virus minute) Parvovirus canin de type 2 Maladie de Carré Adénovirus canin de type 1 <i>Mycoplasma canis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> Bactéries non spécifiques* <i>Toxoplasma gondii</i>

## 1.6) TRAITEMENT

Aucun traitement spécifique de l'herpès-virose canine n'a été mis au point à ce jour.

Des traitements symptomatiques sont mis en place, notamment chez l'adulte pour les formes respiratoires et génitales dans le cas d'atteinte symptomatique. En 2019 un traitement à base de solution de complexes liposomes-TLR (Toll-like receptor) activant les défenses immunitaires des muqueuses a été étudié et serait efficace contre le CHV-1 (Wheat et al. 2019).

Pour les formes oculaires des traitements antiviraux ont été testés avec une amélioration notable des signes cliniques (Gervais et al. 2012; Spertus, Mohammed, Ledbetter 2016; Ledbetter et al. 2018).

En ce qui concerne les atteintes les plus graves notamment chez le chiot plusieurs traitements ont été explorés, tels que des traitements antiviraux et à base d'immun-sérum (Greene 2012; Charles et al. 2022).

## **1.7) PROPHYLAXIE**

### ***1.7.1) PROPHYLAXIE SANITAIRE***

La prophylaxie sanitaire repose sur 3 points clés afin de limiter la contamination des chiots nouveau-nés. Le premier point est de garantir une température corporelle du chiot de 38,5°C minimum car, comme vu précédemment, l'hypothermie augmente le taux de mortalité. Le second point a pour objectif de limiter la contamination indirecte via l'hygiène des locaux, le virus étant sensible aux solvants lipidiques et aux désinfectants communs. Enfin le dernier point a pour objectif d'éviter la contamination des chiots nouveau-nés en isolant les mères trois semaines avant la mise-bas ainsi que pendant les trois semaines suivantes. Le but est d'éviter chez la mère la réactivation du virus en latence ou la primo-infection et d'éviter dans un second temps une primo-infection précoce chez les chiots (Kustritz 2006).

### ***1.7.2) PROPHYLAXIE MEDICALE***

Un seul vaccin a été mis au point chez la femelle gestante afin de permettre une immunisation passive des chiots via la prise colostrale. L'autorisation de mise sur le marché de celui-ci a été obtenue le 26 mars 2001, il s'agit du EURICAN® Herpes 205. C'est un vaccin sous-unité, en effet il existe un risque de latence avec un vaccin vivant. Le protocole vaccinal est composé d'une première injection une semaine à dix jours après la saillie ou l'insémination artificielle et d'une seconde une à deux semaines avant la mise-bas.

## **1.8) LATENCE**

Les Herpesvirus sont capables d'entrer en latence. Cela signifie que le virus persiste dans l'organisme infecté, sans se répliquer et en échappant au système immunitaire. Ce mécanisme est composé de trois phases distinctes : l'entrée en latence, la persistance de la latence et la sortie de latence.

### ***1.8.1) ENTREE EN LATENCE***

Le mécanisme d'entrée en latence du CHV-1 est encore inconnu à ce jour. Néanmoins le virus a été mis en évidence dans différents tissus alors même que le chien ne présentait aucun



signe clinique, cela signifie qu'il y était en latence. Ces tissus sont notamment des tissus nerveux, comme lors d'infection par les autres alphaherpesvirus. Le CHV-1 a été mis en évidence dans un premier temps dans le ganglion trijumeaux (Miyoshi et al. 1999), puis dans le ganglion vestibulaire et le labyrinthe situé au niveau de l'oreille interne (Parzefall et al. 2011). Le virus a été également mis en évidence dans des tissus lymphoïdes, comme les amygdales, les nœuds lymphatiques rétropharyngiens, mésentériques et bronchiques (Miyoshi et al. 1999). Le génome a été identifié au niveau des noyaux des lymphocytes et des neurones (Miyoshi et al. 1999).

### ***1.8.2) PHASE DE LATENCE***

Pendant la phase de latence l'ADN viral est intégré dans les noyaux cellulaires sous forme de multiples épisomes circulaires. Plusieurs mécanismes permettent d'éviter l'expression des gènes viraux, exprimés normalement lors des phases actives et qui sont susceptibles d'activer le système immunitaire. Lors de cette phase, les alphaherpesvirus, dont le CHV-1 fait parti, expriment de longs ARN non codants antisens d'ARN viraux exprimés lors de la phase active de l'infection (Cohen 2020). Cela permet d'empêcher l'expression de ces ARN et évitant ainsi l'activation du système immunitaire.

### ***1.8.3) REACTIVATION ET SORTIE DE LATENCE***

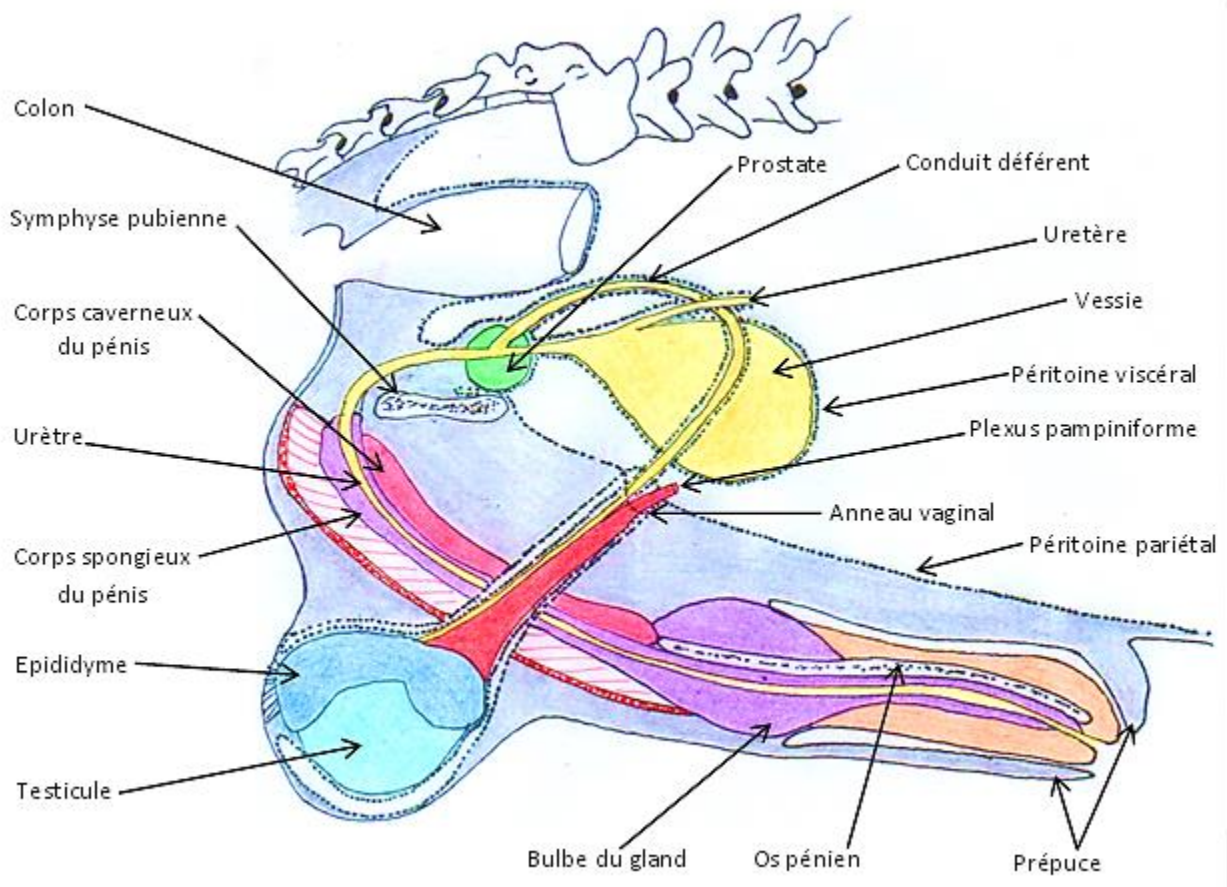
La réactivation du virus peut être soit provoquée soit spontanée. La réactivation spontanée semble plutôt rare (Ledbetter et al. 2012). Les facteurs de réactivations sont multiples. Une immunosuppression déclenchée par l'administration de glucocorticoïdes peut être à l'origine d'une ré-excrétion du virus (Ledbetter, Kim, et al. 2009). De même qu'une immunodépression liée au stress (Greene 2012; Jager et al. 2017). Le lien entre la réactivation du CHV-1 et le cycle ovarien ainsi que la gestation et la lactation a été étudié et aucune variation significative du titre en anticorps n'a été trouvée (Ström Holst et al. 2012). La réactivation du CHV-1 peut être liée à une infection concomitante, comme c'est le cas dans le syndrome « Toux de chenil » avec une atteinte respiratoire (Erles et al. 2004)

## DEUXIEME PARTIE : PRODUCTION DU SPERME, INTERACTION SPERME-VIRUS (HERPES) ET DETECTION DE CES DERNIERS

### 2.1) PRODUCTION DE SPERME CHEZ LE CHIEN

#### 2.1.1) RAPPELS ANATOMIQUES DE L'APPAREIL GENITAL DU CHIEN MALE (BARONE 1978)

L'appareil génital du chien mâle est composé de plusieurs organes, assurant la production et l'émission des spermatozoïdes. C'est aussi le lieu de production d'hormones sexuelles. Il est composé des testicules, des voies spermatiques, du pénis et des glandes annexes.

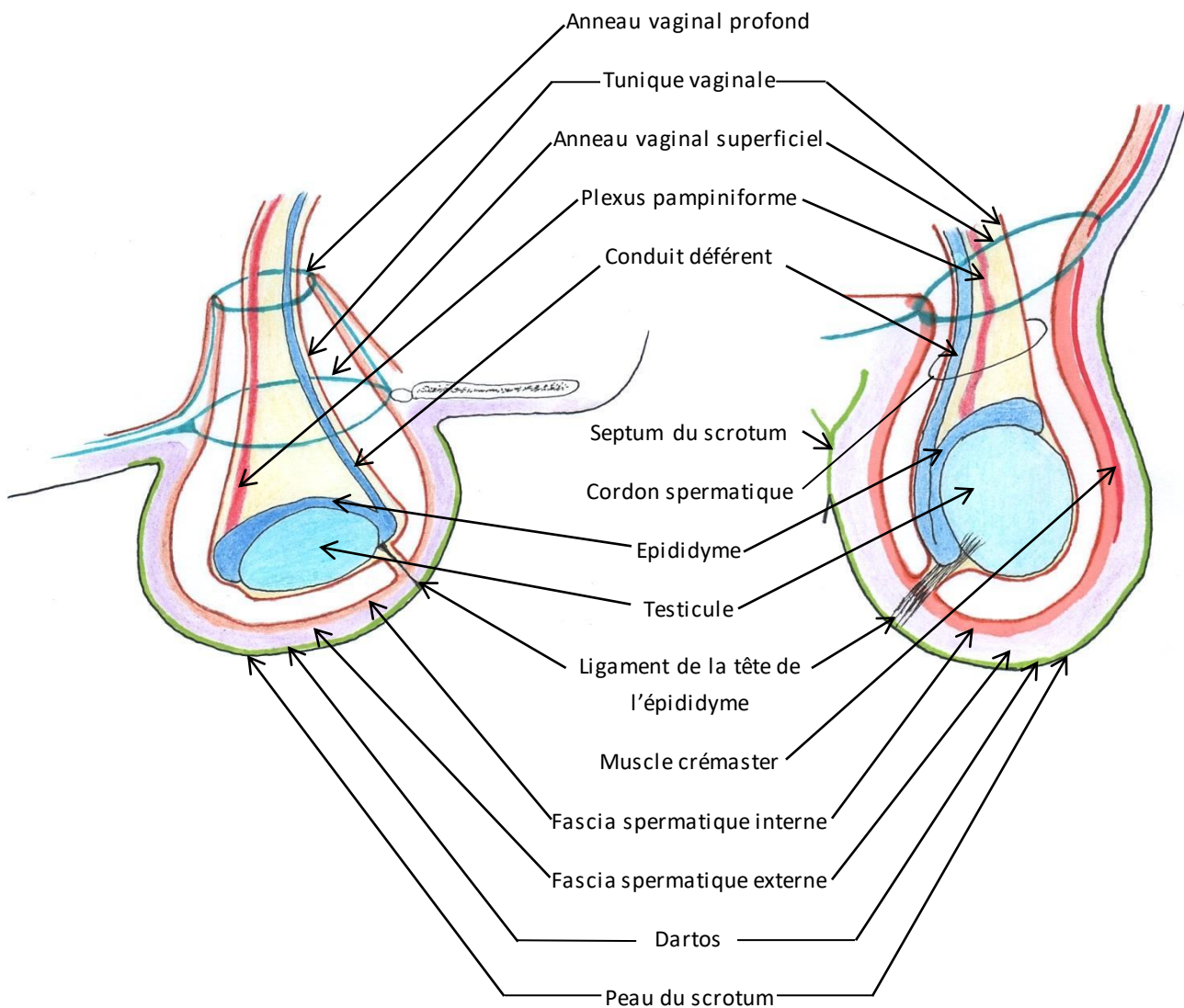


*Figure 3 : Coupe longitudinale de l'appareil génital du chien mâle (réalisation personnelle, d'après Hermanson et al, 2020)*

#### 2.1.1.1) Testicule et voies spermatiques

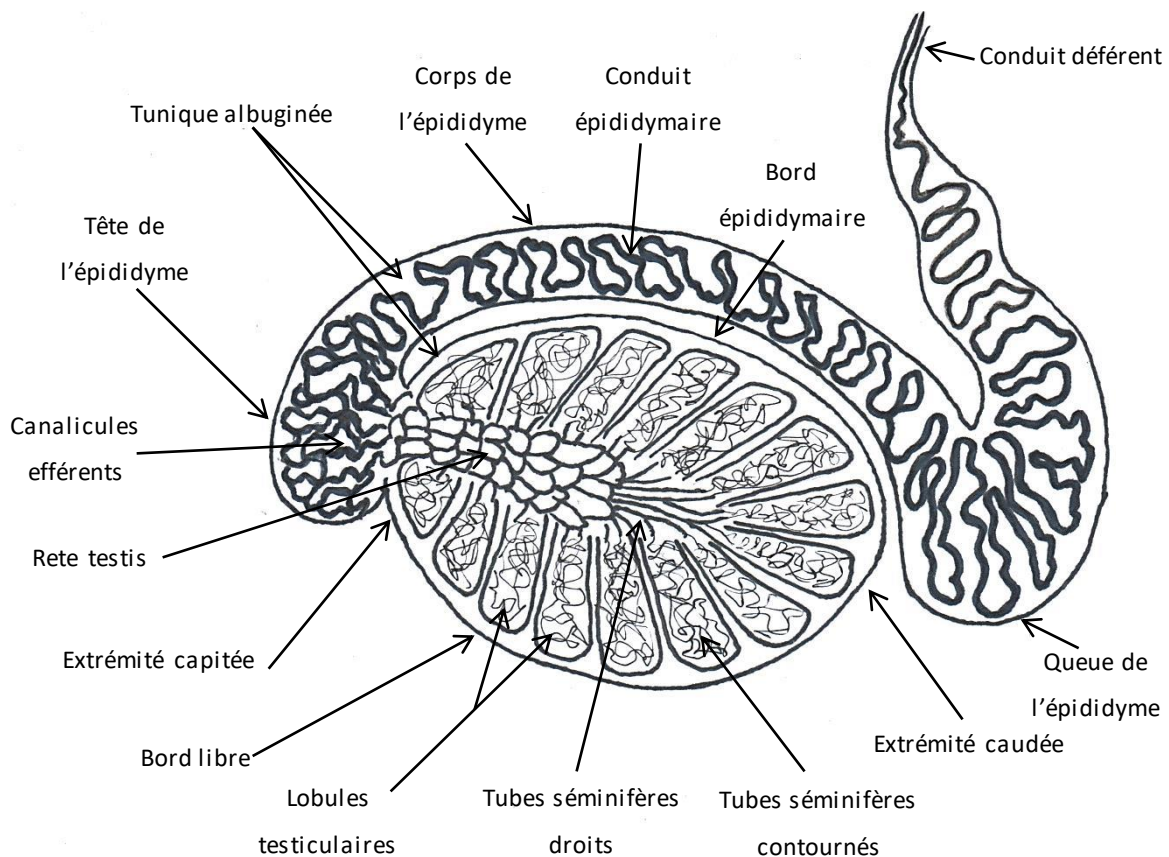
Les testicules, au nombre de deux, sont les glandes responsables de la production des spermatozoïdes au cours de la spermatogenèse, ainsi que de la production de la testostérone, l'hormone sexuelle mâle.

Les testicules sont contenus dans plusieurs enveloppes. L'enveloppe la plus superficielle est le scrotum, situé en région périnéale ventrale. Le scrotum est composé de deux parties : la partie cutanée, commune aux deux glandes, et le dartos. Ce dernier est adhérent à la peau du scrotum et est composé de tissus musculaires lisses, de fibres de collagène et de fibres élastiques. Il est divisé en deux sacs dartoïdes, englobant chacun un testicule. Les sacs sont indépendants et sont divisés par une cloison impaire dans le plan médian, nommée le septum du scrotum. Le dartos assure la suspension des testicules et maintien leurs enveloppes profondes : le fascia spermatique externe (couche de tissu conjonctif et assurant par conséquent la thermorégulation du scrotum), le muscle crémaster (fibres musculaires striées permettant l'ascension du testicule vers la région inguinale en cas de contraction), le fascia spermatique interne et la tunique vaginale.



*Figure 4 : Coupe longitudinale et coupe transversale du testicule et de ses enveloppes en passant par la région inguinale (réalisation personnelle, d'après Christopher-Hennings et al. 2008)*

Les testicules sont de forme ovoïde et constitués d'une tête (ou extrémité capitée), d'une queue (ou extrémité caudale), d'une face latérale, d'une face médiale, d'un bord libre et d'un bord épидидymaire, où débute l'épididyme. Le testicule est composé d'un revêtement séreux correspondant au péritoine testiculaire, puis de la tunique albuginée, une membrane fibreuse et épaisse. De la partie la plus profonde de cette tunique partent des cloisons qui viennent diviser le tissu testiculaire en plusieurs lobules, appelé lobules testiculaires. C'est dans ces lobules que se trouvent les tubes séminifères droits et contournés ainsi qu'un tissu glandulaire interstitiel. Les tubes séminifères contournés sont le lieu de production des spermatozoïdes. Une fois ceux-ci produits ils vont cheminer dans les tubes séminifères droits, qui représentent le tout début des voies spermatiques. Ces tubes droits viennent s'anastomoser au niveau du *rete testis* d'où partent les canalicules efférents qui pénètrent dans la tête de l'épididyme.



*Figure 5 : Coupe longitudinale d'un testicule (réalisation personnelle, d'après Constantinescu 2007)*

L'épididyme est le premier organe des voies spermatiques, les spermatozoïdes y sont en parti stockés et y mûrissent pour devenir féconds au cours de leur progression. Il est divisé en trois portions : la tête, le corps et la queue. La tête reçoit les canalicules efférents de l'extrémité

capitée du testicule, à laquelle elle est rattachée notamment par le ligament de la tête de l'épididyme. Ces canalicules se rejoignent pour aboutir à un conduit unique : le conduit épидидymaire. Ce conduit mesure 5 à 10 mètres chez le chien et traverse l'ensemble de l'épididyme jusqu'à sa queue. Cette dernière contourne l'extrémité caudée du testicule et est rattachée à ce dernier par le ligament propre du testicule. Elle est poursuivie par le conduit déférent. L'ensemble testicule et épидидyme est rattaché à la tunique vaginale par le ligament de la queue de l'épididyme.

Le conduit déférent s'étend de la queue de l'épididyme jusqu'à l'urètre. Il passe donc dans le cordon spermatique, traverse l'anneau vaginal et se retrouve à la face dorsale de la vessie. Les deux conduits se rapprochent l'un de l'autre en cette portion vésicale. Ils traversent par la suite la prostate avant d'atteindre l'urètre.

L'urètre est le conduit unique permettant l'excrétion de l'urine et du sperme. Il part du col de la vessie et reçoit la terminaison des voies spermatiques, jusqu'à rejoindre le pénis. Il est divisible en deux portions : l'urètre pelvien et l'urètre pénien. L'urètre pénien possède dans sa paroi un tissu érectile, formant le corps spongieux.

### **2.1.1.2) Pénis**

Le pénis est l'organe copulateur du mâle. Chez le chien il est localisé en région sous-pubienne et est recouvert par le prépuce formant un fourreau autour de l'ensemble du pénis au repos. Il est composé du corps spongieux de l'urètre, des corps caverneux et du corps spongieux du gland. Le pénis est séparé en 3 parties : le corps encadré d'un côté par la partie libre, terminée par le gland, et de l'autre par une partie fixe appelée racine.

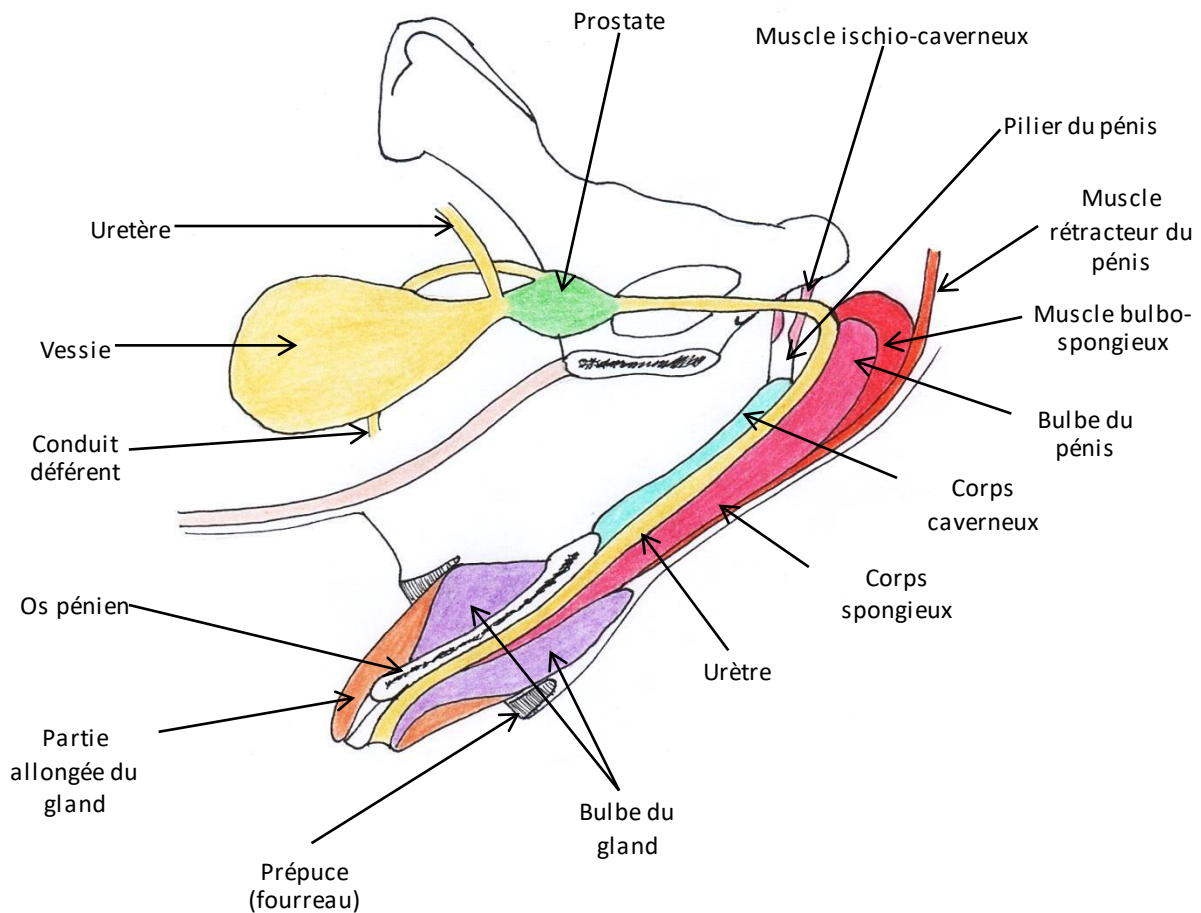
Le corps du pénis est cylindroïde. Sa face ventrale est la face urétrale, tandis que la face dorsale, constituant le dos du pénis, contient un large réseau vasculaire.

La racine du pénis est divisée en deux branches latérales : les piliers du pénis, couverts par les muscles ischio-caverneux. Entre ces deux piliers se situent le bulbe du pénis.

Chez le chien le gland est très long et occupe toute la partie libre du pénis. Caudalement se trouve le bulbe du gland, qui se dilate lors de l'accouplement. Le reste du gland s'appelle la partie allongée du gland. Au sein du gland se trouve l'os pénien. En face ventrale se situe l'ostium de l'urètre.

Les trois muscles principaux du pénis sont :

- les muscles rétracteurs du pénis : au nombre de deux, ils interviennent dans le retour en position de repos du pénis
- le muscle bulbo-spongieux : localisé au niveau du corps spongieux
- les muscles ischio-caverneux : au nombre de deux, ils relient les piliers du pénis aux tubérosités ischiatiques, ils interviennent dans le mécanisme de l'érection.



*Figure 6 : Schéma des structures pelviennes et coupe longitudinale du pénis (réalisation personnelle, d'après L. Buchholz, DVM Class of 1994, (Hermanson, De Lahunta, Evans 2020))*

### 2.1.1.3) Glandes annexes

#### 2.1.1.3.1) Prostate

La prostate est une glande composée d'un corps, compact et bilobé, et de lobules disséminés sur le trajet de l'urètre. Le corps de la prostate est globuleux et entoure complètement la partie initiale de l'urètre. Il mesure 2 à 3 cm. Il est composé de deux lobes, séparés par un net sillon médian. La partie disséminée est représentée par quelques lobules. Le parenchyme de la

prostate est constitué de plusieurs lobules glandulaires de taille irrégulière, formant des groupes de glandes tubulo-alvéolaires se déversant dans l'urètre via un canal collecteur.

#### *2.1.1.3.2) Glandes préputiales*

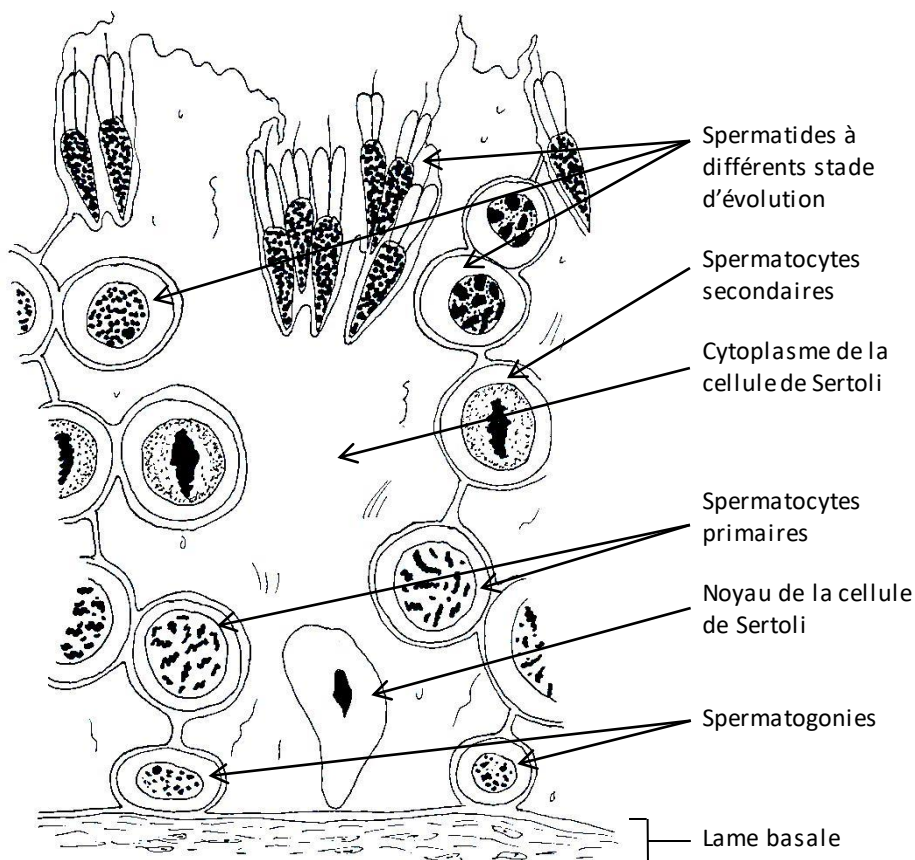
Les glandes préputiales sont localisées au niveau de la lame interne du prépuce. Il s'agit d'une glande sébacée particulière, produisant le smegma préputial.

**L'appareil génital du chien mâle est donc composé de plusieurs organes permettant la production et l'émission de spermatozoïdes et également la production de testostérone. Mais cet appareil génital est aussi une interface entre le milieu extérieur et l'organisme : le pénis, l'urètre et le prépuce sont en contact direct et constant avec une multitude de pathogènes. Il en va de même lors de la reproduction où un contact étroit s'établit avec les muqueuses de l'appareil génital de la femelle. Enfin, l'appareil génital mâle n'est pas coupé de la circulation générale : tout épisode de bactériémie ou virémie est susceptible d'y amener des agents pathogènes.**

## 2.1.2) DE LA PRODUCTION A L' EMISSION DU SPERME

### 2.1.2.1) Tube séminifère : unité de production des spermatozoïdes

Au sein des lobules spermatiques se trouvent les tubes séminifères contournés. S'y trouvent également des glandes interstitielles, composées des cellules de Leydig, et un stroma, composé de tissu conjonctif lâche, associé à des capillaires sanguins et lymphatiques. Les tubes séminifères sont entourés (de l'intérieur vers l'extérieur) par : une lame basale sur laquelle reposent les cellules de Sertoli, une couche de tissu conjonctif, des cellules myoïdes (cellules fusiformes à propriétés contractiles) et d'un stroma conjonctif. L'épithélium des tubes séminifères est stratifié et est composé de cellules de soutien, appelées cellules de Sertoli et des cellules germinales dont les multiples divisions au cours de la spermatogenèse aboutiront à la production de spermatozoïdes (Barone 1978).



*Figure 7 : Structure d'un tube séminifère contourné (réalisation personnelle, d'après Barone 1978)*



### **2.1.2.2) Spermatogenèse**

La spermatogenèse correspond à l'ensemble des processus physiologiques aboutissant à la formation et à la libération de spermatozoïdes matures. Elle est composée de trois étapes et dure environ 60 jours chez le chien (Soares, Avelar, França 2009).

#### *2.1.2.2.1) Spermatocytogenèse*

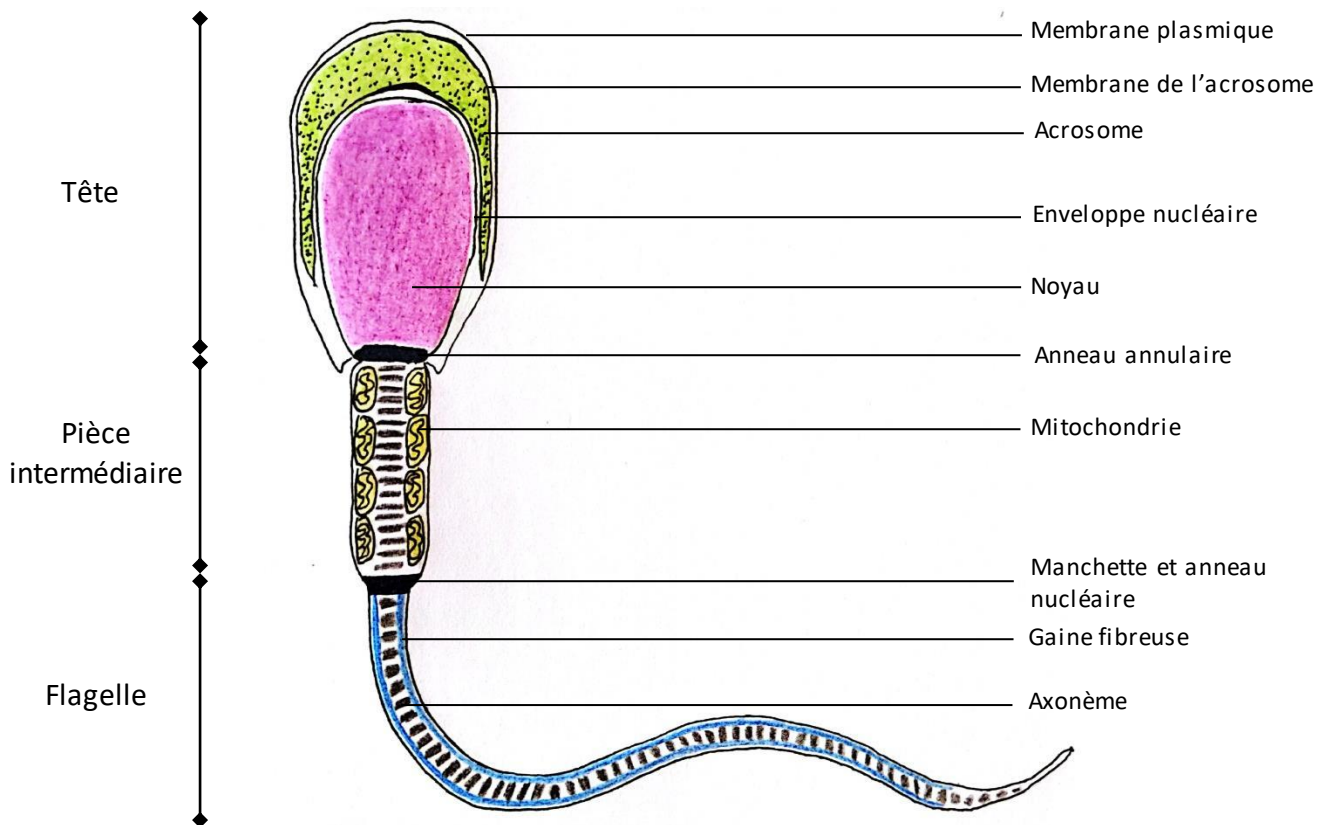
Cette première étape a lieu au niveau de la membrane basale des tubes séminifères contournés, où se trouvent les spermatogonies. Ces cellules se divisent par mitose aboutissant à la production de spermatocytes primaires. Le nombre de spermatogonies est constant. Les spermatocytes primaires subissent ensuite une division par méiose, menant à la production de spermatocytes secondaires (première division de méiose). A partir de ces spermatocytes secondaires, la seconde division de méiose permet d'aboutir à la production de quatre spermatides haploïdes (Chłopik, Wysokińska 2020).

#### *2.1.2.2.2) Spermiogénèse*

Cette seconde étape regroupe l'ensemble des transformations permettant un passage d'une spermatide sphérique à un spermatozoïde mature allongé et mobile. Ces étapes consistent notamment en la formation de l'acrosome et de l'axonème, en la polarisation du noyau et de l'acrosome, initiant la phase d'élongation de la spermiogénèse. A ce stade, le spermatide est relié à la cellule de Sertoli via une unique jonction intercellulaire (Wong, Mruk, Cheng 2008). Le noyau se condense jusqu'à former la tête du futur spermatozoïde, dont la forme est spécifique d'espèce (O'Donnell 2015).

#### *2.1.2.2.3) Spermiation*

Cette troisième et dernière étape a lieu une fois la spermiogénèse terminée, c'est-à-dire lors de l'obtention de spermatozoïdes matures encore rattachés aux cellules de Sertoli. La spermiation correspond à la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères, après phagocytose du cytoplasme résiduel par la cellule de Sertoli (O'Donnell 2015; H. Chen et al. 2021).



*Figure 8 : Schéma d'un spermatozoïde (réalisation personnelle, d'après Sirivaidyapong 2000)*

#### 2.1.2.2.4) Les conditions nécessaires à la spermatogenèse

La spermatogenèse débute lors de la puberté (Lee et al. 2017). Elle est par la suite régulée par les sécrétions hormonales. Notamment elle dépend de la sécrétion de FSH (hormone de stimulation folliculaire) et d'androgènes, produits localement en réponse à la LH (hormone lutéinisante). La régulation de la spermatogenèse se fait principalement via des récepteurs sur les cellules de Sertoli. La FSH augmente la production de spermatogonies et de spermatocytes et stimule la spermiation. Les androgènes régulent également la prolifération des spermatogonies et permettent aux spermatocytes d'accomplir leur méiose et de former des spermatides. Enfin ils jouent également un rôle dans le déroulement de la spermiation (O'Shaughnessy 2014).

La température est également un paramètre clé dans le bon déroulé de la spermatogenèse. En effet une augmentation de la température des testicules conduit à une diminution de la fertilité avec diminution du nombre de spermatozoïde, voire une stérilité selon la durée d'exposition à la chaleur (Wallach, Kandeel, Swerdloff 1988; Lyrio et al. 2023). Cette

altération de la fertilité a été démontrée chez le singe et le rat comme étant liée à l'induction d'une apoptose des cellules souches par la chaleur, et est réversible (Liu 2010).

### **2.1.2.3) Ejaculation**

L'éjaculation chez le chien se sépare en trois phases. La première phase éjaculée après l'intromission du pénis dans le vagin de la femelle est la phase urétrale. Elle provient en grande partie de la prostate. Elle est limpide ou légèrement trouble et varie entre 0,5 et 20 ml, voire plus. La seconde fraction est la phase spermatique, soit la phase contenant la quasi-totalité des spermatozoïdes. Elle est opaque, d'une couleur blanc laiteuse et varie entre 0,5 et 2 ml. Elle est constituée des spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme et des spermatozoïdes produits le jour même. Rapidement après, le chien va effectuer une rotation de 180°, lui permettant de se retrouver dos à la femelle. Il va alors émettre la troisième fraction de l'éjaculat, qui est la phase prostatique. Elle est limpide, et son volume de plusieurs millilitres peut varier selon la durée de l'accouplement (Freshman 2002).

### **2.1.2.4) Composition du sperme**

Le sperme du chien est séparé en trois phases comme vu précédemment et est composé en partie de spermatozoïdes et de liquide, communément appelé liquide séminal (appellation fautive du fait de l'absence de vésicule séminale chez le chien) ou parfois liquide urétral. On retrouve également dans le sperme des cellules et débris cellulaires, provenant des voies spermatiques.

La fraction cellulaire mise à part, on va retrouver dans ces phases principalement les mêmes molécules dans des proportions différentes. Dans une étude portant sur l'origine de la fraction urétrale (England, Allen, Middleton 1990), les trois fractions ont été comparées selon leur concentration en protéines totales, calcium, magnésium, phosphore inorganique, créatinine, sodium et potassium. On notera que la principale différence réside en une concentration protéique totale plus faible de la première phase par rapport aux deux autres. Cette différence s'accompagne d'une concentration en créatinine plus importante dans la première phase (voir **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

*Tableau 3 : concentrations biochimiques dans les trois fractions de 20 éjaculats canins (England, Allen, Middleton 1990)*

**TABLE 1: Mean ( $\pm$  SD) biochemical concentrations in first, second and third fractions of 20 dog ejaculates**

Fraction	Total protein (g litre <sup>-1</sup> )	Calcium (mmol litre <sup>-1</sup> )	Magnesium (mmol litre <sup>-1</sup> )	Inorganic phosphorus (mmol litre <sup>-1</sup> )	Creatinine ( $\mu$ mol litre <sup>-1</sup> )	Sodium (mmol litre <sup>-1</sup> )	Potassium (mmol litre <sup>-1</sup> )
1st	14.4 (9.9)	0.31 (0.14)	0.85 (0.34)	1.14 (1.06)	468 (286)	146 (7.6)	7.57 (2.60)
2nd	42.5 (41.2)	0.46 (0.35)	1.12 (0.53)	1.34 (1.09)	145 (138)	145 (12.4)	10.78 (3.39)
3rd	30.7 (16.8)	0.31 (0.26)	0.84 (0.48)	0.31 (0.19)	103 (84)	143 (6.7)	10.27 (2.55)

On retrouve également dans le liquide séminal d'autres ions, tels que du zinc et du cuivre (Schäfer-Somi, Palme 2016).

En ce qui concerne la fraction protéique, l'étude du génome du sperme canin révèle la présence de 268 protéines différentes, dont 251 en commun entre la phase spermatique et la phase prostatique. Les deux protéines les plus présentes sont l'arginine estérase et les précurseurs de la lactotransferrine. Le rôle exact de la première au sein du sperme n'est pas encore connu. Quant à la lactotransferrine, elle pourrait refléter la fonction gonadique du chien. Le reste des protéines identifiées sont souvent liées à plusieurs fonctions moléculaires : catalyse, activité antioxydante, transduction, ou encore comme protéines de liaison et de structure (Aquino-Cortez et al. 2017).

Le liquide séminal est composé également d'une fraction lipidique, avec la présence notamment de cholestérol (Schäfer-Somi, Palme 2016) mais également d'acides gras. 18 acides gras ont pu être identifiés, dont 85% d'acide gras saturés (majoritairement des acides oléiques) et 15% d'acides gras insaturés (par ordre décroissant : acides palmitiques, acides stéariques et acides myristiques) (Díaz et al. 2014). Ces acides gras ont aussi été retrouvés dans le sperme d'autres espèces, et sont associés à la mobilité du sperme, à sa viabilité et également à la réaction de l'acrosome (Hossain et al. 2007; Díaz et al. 2014).

Plusieurs molécules antioxydantes ont été mises en évidence dans le liquide urétral. S'y trouvent des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, la glutathion peroxydase de l'hydroperoxyde de phospholipides et des enzymes catalases (glutathione peroxidase et superoxide dismutase) (Angrimani et al. 2014; Strzezek et al. 2009). Des antioxydants de faibles poids moléculaires ont également été identifiés, tels que le L-glutathione, L-ergothione et l'acide L-ascorbique (Strzezek et al. 2009). Tous ces éléments antioxydants

permettent au liquide urétral de protéger les spermatozoïdes des réactions d'oxydation, telles que les dégradations mitochondriales et la peroxydation lipidique (Vieira et al. 2018).

**La spermatogenèse a lieu dans les tubes séminifères, contenus dans les testicules. La spermatogenèse est hormonodépendante. Elle dépend également de la température. Elle se déroule en trois étapes :**

- **Spermatocytogénèse : succession de divisions mitotiques puis méiotique, aboutissant à la production de spermatides haploïdes immatures.**
- **Spermiogénèse : transformation des spermatides immatures en spermatozoïdes matures.**
- **Spermiation : libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères.**

**Les spermatozoïdes sont émis lors de l'éjaculation. Chez le chien elle est composée de 3 phases : la phase urétrale, la phase spermatique et la phase prostatique. Le sperme voit sa composition varier légèrement entre ces trois phases. Il est composé notamment d'ions, de lipides, de protéines et s'y trouvent des antioxydants, ayant un rôle de protection de spermatozoïdes.**

## **2.2) INTERACTIONS SPERME-VIRUS**

Le sperme peut être une matière virulente et être à l'origine d'une contamination de la femelle, que ce soit lors d'un accouplement naturel ou lors d'insémination artificielle. Le premier objectif de ce paragraphe est d'étudier les éventuelles transmissions vénériennes d'herpèsvirus, vectorisés par le sperme. Pour cela un état des lieux des connaissances chez différentes espèces sera réalisé. Le second objectif est de faire un état des lieux des connaissances actuelles sur l'immunité antivirale et sur l'immunité de l'appareil génital mâle. Enfin le troisième objectif est de s'intéresser à l'impact modulateur du sperme sur les infections virales.

### ***2.2.1) TRANSMISSION VENERIENNE D'HERPESVIRUS VIA LE SPERME***

En l'absence d'information dans la littérature sur le risque de transmission de l'herpèsvirus canin par le sperme lors de la reproduction, il nous a paru intéressant de collecter les informations disponibles chez d'autres espèces. De ce fait, plusieurs herpèsvirus ont pu être identifiés dans le sperme chez différentes espèces, associés parfois à un risque avéré de transmission par ce biais. Les objectifs sont :

- L'identification des herpèsvirus qui ont été mis en évidence dans le sperme, et quelles ont été les techniques utilisées
- La recherche de cas décrits de transmission d'herpèsvirus via le sperme
- L'étude de la position extracellulaire ou intracellulaire des herpèsvirus par rapport aux spermatozoïdes et quelles sont les techniques associées

Quatre espèces ont été retenues. Il s'agit de l'Homme, du bovin, du porc et du cheval. Au moins un type herpèsvirus a été mis en évidence dans le sperme pour chacune de ces espèces.

#### **2.2.1.1) Chez l'homme**

Vingt-sept virus ont pu être identifiés dans le sperme humain au cours des dernières années. Parmi ceux-ci, se trouvent tous les herpèsvirus humains, au nombre de 8 (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, HHV-6-8, and HCMV). Les herpèsvirus humains représentent un risque important pour la fertilité en altérant les caractéristiques du sperme et des spermatozoïdes (de Albuquerque et al. 2022).

Les herpèsvirus simplex 1 et 2, sont des *Alphaherpesvirus*, du genre *Simplexvirus*. Ils sont à l'origine de lésions buccales (herpès labial), souvent lié au HSV-1 ou de lésions génitales (herpès génital), plus souvent liées au HSV-2. Ces virus sont transmissibles par contact avec les lésions et notamment lors des rapports sexuels (Kaspersen, Höllsberg 2013). Les deux virus ont été identifiés à plusieurs reprises dans le sperme humain (de Albuquerque et al. 2022). Plusieurs techniques ont été utilisées : PCR (Wald et al. 1999; Bezold et al. 2001; Neofytou et al. 2009), PCR multiplexe et PCR nichée (Tavakolian et al. 2021).

Une seule étude datant de 1989 décrit la transmission du virus HSV-2 via le sperme d'un donneur. Le virus a pu être identifié au niveau du col de l'utérus de la receveuse par analyse des isolats du HSV-2 après digestion par des enzymes de restriction (Moore et al. 1989). Néanmoins la voie principale de transmission du virus étant liée aux muqueuses, il est difficile d'estimer le risque de transmission par le sperme seul (Kaspersen, Höllsberg 2013). Par la suite il a été montré que le virus était capable de se lier à la membrane plasmique des spermatozoïdes (Pallier et al. 2002) et également que le virus pouvait être internalisé dans la tête du spermatozoïde (Bocharova et al. 2007).

Le virus Varicelle-Zona (VZV) est un *Alphaherpesvirus*, du genre *Varicellovirus*, responsable de la varicelle lors de sa primo-infection, puis de zona lors de ses réactivations. Il a été mis en évidence dans le sperme à quelques reprises, par PCR et PCR nichée (Neofytou et al. 2009; Behboudi et al. 2019), mais sa présence y reste controversée (Kaspersen, Höllsberg 2013; de Albuquerque et al. 2022).

Le cytomégalovirus humain (HCMV) est un *Bétaherpesvirus*, du genre *Cytomégalovirus*. Le virus est souvent à l'origine d'infection asymptomatique, mais peut être associé à des complications chez les individus immunodéprimés, le HCMV pouvant toucher quasiment tous les organes. Dans le cas de transmission verticale, l'infection chez le nouveau-né peut être associée à de graves séquelles. Le virus est excrété dans la majorité des fluides de l'organisme, y compris dans le sperme, où il a été mis en évidence par PCR et PCR nichée (Neofytou et al. 2009; Eggert-Kruse et al. 2009; Gimenes et al. 2014). Le virus peut être attaché à la membrane des spermatozoïdes et pénétrer à l'intérieur (Pallier et al. 2002). Néanmoins, la transmission par voie sexuelle ne semble pas être la plus fréquente (Eggert-Kruse et al. 2009). Le virus est également en mesure d'infecter les cellules germinales, et a été retrouvé par immunomarquage dans les spermatides, les spermatogonies, les spermatocytes et enfin les spermatozoïdes. Les virions ont

pu être visualisé en localisation intracellulaire par microscopie électronique (Naumenko et al. 2011).

Le virus de l'herpèsvirus humain 6 (HHV-6) regroupe 2 virus, le HHV-6A et le HHV-6B, mais les méthodes d'analyses les plus fréquemment utilisées ne permettent pas de les différencier. Ce sont deux *Betaherpesvirus*, du genre *Roseolovirus*. L'infection cause un exanthème subit. Le virus est retrouvé dans la salive, qui est suspectée comme étant la matière virulente principale (Kaspersen, Höllsberg 2013). Le virus est fréquemment retrouvé dans le sperme (de Albuquerque et al. 2022), notamment par analyse PCR (Bezold et al. 2001; Godet et al. 2015). Une analyse par microscopie confocale (microscopie à fluorescence) du sperme infecté a mis en évidence un lien entre le virus et l'acrosome des spermatozoïdes, suggérant l'existence d'un récepteur spécifique exploité par le virus (Kaspersen et al. 2012). De plus, le HHV-6 est capable d'intégrer son génome dans celui des cellules qu'il infecte. Godet *et al* ont étudié la présence de HHV-6 intégré chromosomiquement dans les spermatozoïdes. Certains résultats sont en faveur d'une intégration du génome du HHV-6 dans le génome du spermatozoïde, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour l'affirmer. Ces résultats se basent sur la charge virale qui serait plus importante dans le cas où le génome viral serait intégré dans le génome du spermatozoïde (Godet et al. 2015).

L'herpèsvirus humain 7 (HHV-7) est un *Bétaherpesvirus*, du genre *Roseolovirus*, proche du HHV-6. La majorité des infections par ce virus sont asymptomatiques. Il a été détecté dans le sperme, par PCR et microarrays, mais le risque de transmission sexuelle n'a pas été étudiée (Kaspersen et al. 2012; Kaspersen, Höllsberg 2013).

Le virus d'Epstein-Barr est un *Gammaherpesvirus*, du genre *Lymphocryptovirus*. Il infecte principalement les lymphocytes B. Il est à l'origine de la mononucléose. Sa transmission se fait principalement par la salive mais peut également être sexuelle (Kaspersen, Höllsberg 2013). Le virus a été mis en évidence dans le sperme à plusieurs reprises par PCR (Bezold et al. 2001; Neofytou et al. 2009; Thomas et al. 2006). La transmission lors de rapport sexuel semble possible, mais la salive reste la matière virulente principale (Thomas et al. 2006). La transmission par le sperme semble également possible, même si non prouvée, mais serait rare (Houen, Trier 2020).

L'herpèsvirus humain 8 (HHV8) est une *Gammaherpesvirus*, du genre *Rhadinovirus*. Il est aussi appelé herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV), du fait de son implication dans le développement de sarcome de Kaposi chez les individus positifs au virus de l'immunodéficience



humaine (VIH) (Kaspersen, Höllsberg 2013). Ce sarcome est une tumeur de bas grade, touchant la peau, les muqueuses et les viscères, se manifestant par des macules évoluant en plaques puis en nodules (Radu, Pantanowitz 2013). Le virus a été identifié dans le sperme, notamment dans le sperme des individus séropositifs au VIH. De plus, lors d'analyses par PCR nichée, PCR in situ et par isolement d'ADN, il a été montré que le virus s'associe aux cellules séminales (cellules mononuclées et spermatozoïdes), et est en capacité de venir infecter des cultures cellulaires. Il semble donc que le HHV-8 soit capable d'infecter le sperme, de se lier aux spermatozoïdes et d'être transmis par ce biais (Bagasra et al. 2005).

### **2.2.1.2) Chez le bovin**

Plusieurs herpèsvirus ont été identifiés chez le bovin. Leur impact économique sur la reproduction étant important, le risque de transmission par le sperme a été plusieurs fois étudié.

L'Alphaherpèsvirus bovin de type 1 (BoHV-1), comme le CHV-1, est un herpèsvirus appartenant à la sous-famille des alpha-herpesviridae et au genre Varicellovirus. Il est responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine. Le virus a été découvert initialement sur des animaux présentant une atteinte respiratoire haute, mais le tableau clinique est large. Il peut se traduire par des atteintes de l'appareil reproducteur associées parfois à des troubles de la reproduction. Les animaux peuvent également être asymptomatiques. Le virus est capable d'entrer en latence dans les ganglions nerveux (van Oirschot 1995)..

Le virus a été mis en évidence dans le sperme par plusieurs méthodes, notamment par isolement viral et par PCR. Il a également été mis en évidence via amplification isotherme médiée par boucle (LAMP) (Pawar et al. 2014; Ali et al. 2022). Il a été mis en évidence chez les taureaux présentant des symptômes mais aussi chez des animaux asymptomatiques. La transmission du virus est possible via le sperme, notamment lors d'insémination artificielle à partir de sperme infecté par le virus (van Oirschot 1995).

En ce qui concerne le lieu de réplication du virus au sein d'appareil génital du taureau, l'hypothèse principale est une contamination du liquide séminal en contact de la muqueuse préputiale et pénienne lors de l'éjaculation (van Oirschot 1995). Une analyse de sperme de taureau infecté par BoHV-1, par immunofluorescence directe et indirecte a permis de mettre en évidence la présence du virus dans le liquide séminal et au niveau de la tête du spermatozoïde, sans pouvoir établir si le virus est attaché à la surface ou présent dans le cytoplasme (Elazhary et

al. 1980). Une étude plus récente a pu mettre en évidence la présence de virus dans les tissus testiculaires et épидидymaires, suggérant que ceux-ci soient également des lieux de réplication du virus (Dias Queiroz-Castro et al. 2021). Enfin le virus se lie avec les spermatozoïdes par le biais des glycoprotéines gC et gD, mécanisme comparable avec celui permettant au virus de se lier avec les cellules qu'il infecte (Tanghe et al. 2005).

L'herpèsvirus bovin de type 5 (BoHV-5) est également un *alphaherpesvirus* du genre *Varicellovirus*. Il est responsable de l'encéphalite herpétique bovine, mais également a été mis en cause dans certaines atteintes respiratoires ou lors de troubles de la reproduction (Favier, Marin, Pérez 2012). Les premières mises en évidence de ce virus dans le sperme ont fait suite à de nouvelles analyses d'échantillons faussement positifs à BoHV-1. En effet ces échantillons ont été montrés positifs à BoHV-5 et non pas à BoHV-1 (Esteves et al. 2003; Gomes et al. 2003). Il a également été montré que des infections par BoHV-5 avaient eu lieu suite à une contamination par du sperme infecté au cours d'insémination artificielle, le BoHV-5 ayant été identifié par PCR et analyse par enzymes de restriction (Kirkland et al. 2009).

Un troisième herpèsvirus bovin, le BoHV-4, a été retrouvé dans le sperme de taureau (Morán et al. 2013). Il s'agit d'un cytomégalovirus, parfois impliqué dans les troubles de la reproduction, mais il s'agit surtout d'un co-facteur dans le développement de réaction inflammatoires liées à des bactéries (Chastant-Maillard 2015). Son impact sur la reproduction est moindre que les deux virus cités précédemment, pouvant expliquer le peu de recherches ayant été réalisées sur la transmission de ce virus par le sperme au cours de la reproduction.

### **2.2.1.3) Chez le porc**

Le virus de la pseudorage ou virus de la maladie d'Aujeszky (PRV) est un *alphaherpesvirus*, du genre *Varicellovirus*. La maladie est connue depuis le XIXème siècle, mais a vraiment été décrite à partir du début du XXème. L'hôte principal du virus est le porc, mais le virus est capable d'infecter d'autres vertébrés. La maladie se manifeste chez le porc par une atteinte du système nerveux central, ou une atteinte respiratoire, et peut se révéler mortelle, notamment chez le jeune. La maladie peut aussi être à l'origine de troubles de la reproduction. La maladie a un impact économique important, liée à la perte d'état des porcs, à la mortalité et les troubles de la reproduction (Pomeranz, Reynolds, Hengartner 2005).

Le virus a été mis en évidence dans le sperme du verroat, par isolement viral dans un premier temps (Vannier, Gueguen 1979; Medveczky, Szabó 1981). Guérin *et al*, utilisent pour la première fois la PCR pour mettre en évidence le virus dans du sperme de verroat artificiellement infecté (Guérin et al. 1995). Par la suite la sensibilité plus importante de la PCR par rapport à l'isolement viral pour la mise en évidence du virus dans le sperme du verroat a été démontrée (van Rijn et al. 2004).

Dans une étude de 1987, une truie contaminée par du sperme de verroat artificiellement infecté par le virus a avorté et des antigènes viraux ont été retrouvés au niveau du vagin et des ganglions nerveux (Dieuzy, Vannier, Jestin 1987). Du fait de l'impact économique majeur de la maladie, le statut des verrats utilisés pour l'insémination artificielle est contrôlé (Althouse, Rossow 2011; Madsen 2005). Le risque de contamination via du sperme infecté est une possibilité, les verrats contaminés sont donc exclus de la reproduction.

#### **2.2.1.4) Chez les équidés**

L'herpèsvirus équin de type 1 (EHV-1), est un *alphaherpesvirus*, du genre *Varicellovirus*. Il entraîne une atteinte respiratoire, une atteinte nerveuse et est également responsable de troubles de la reproduction. Il est hautement contagieux (Réseau d'Epidémiologie-Surveillance en Pathologie Équine 2024).

Le virus a été isolé dans l'épididyme et dans le testicule, avec répliation au sein des cellules endothéliales. Au cours de cette étude le virus a également pu être isolé du sperme (Tearle et al. 1996). Le virus a également pu être identifié dans le sperme par analyse PCR (Hebia-Fellah et al. 2009; Walter et al. 2012; Holz et al. 2019). Aucun cas de contamination par du sperme infecté n'a été décrit, mais le sperme reste une matière virulente suspectée.

A l'inverse, l'herpèsvirus équin de type 4 (EHV-4) est également un *alphaherpesvirus*, du genre *Varicellovirus*. Il est responsable d'atteintes respiratoires et dans de rares cas a été associé à des avortements. Ce virus a un impact économique moins important que l'EHV-1. Il n'a pas été mis en évidence dans le sperme (Hebia-Fellah et al. 2009).

L'herpèsvirus équin de type 3 (EHV-3) est également un *alphaherpesvirus*, du genre *Varicellovirus*. Il est responsable de l'exanthème coïtal équin, une maladie vénérienne caractérisée par des lésions de l'appareil génital externe des étalons et des juments (Barrandeguy, Thiry 2012). Une potentielle contamination du sperme par contact avec les lésions est suspectée, mais non démontrée (Metcalf 2001).

Le risque de transmission d'herpèsvirus lors de la reproduction est avéré, et ce, chez différentes espèces. La transmission est possible par contact entre les muqueuses mais aussi via le sperme contenant le virus. Il a été établi pour certains herpèsvirus, y compris des alphaherpèsvirus, une capacité d'adhérer à la surface des spermatozoïdes, et pour d'autres leur capacité à même pénétrer et infecter le spermatozoïde. Différentes techniques ont été utilisées pour mettre en évidence le virus dans le sperme et pour y localiser le virus (voir paragraphe 2.3).

Face à ce risque de transmission virale par le sperme, il est essentiel de comprendre les mécanismes de défense mis en place par l'organisme. L'immunité antivirale, et plus spécifiquement l'immunité propre à l'appareil génital mâle, joue un rôle clé dans la protection contre les infections virales, y compris celles liées aux herpèsvirus.

## **2.2.2) IMMUNITE ASSOCIEE A LA PRODUCTION ET L'EMISSION DU SPERME**

### **2.2.2.1) Rappels sur l'immunité, en particulier l'immunité antivirale**

L'immunité regroupe l'ensemble des mécanismes biologiques qui permettent à l'organisme d'assurer sa protection et sa survie en éliminant ses propres constituants altérés ou les agents étrangers, notamment infectieux, qui représenteraient une menace. Pour cela un ensemble d'organes, tissus, cellules et molécules va être impliqué et représente ce que l'on appelle le système immunitaire. Le mode d'action de ce système immunitaire se divise en deux systèmes de défense : l'immunité innée et l'immunité acquise. Certains éléments seront spécifiques de la protection de l'organisme face aux virus (pour revue Marcelain et al. 2018).

#### **2.2.2.1.1) Immunité innée**

L'immunité innée est non adaptative et est une réponse immédiate. Elle est basée sur la reconnaissance par les cellules de l'immunité du soi et du non-soi. Elle constitue la première ligne de défense, elle active et régule la réponse immunitaire adaptative. Elle est régie par des mécanismes cellulaires et humoraux. Parmi les cellules de l'immunité innée on retrouve : les granulocytes, les macrophages et monocytes, les mastocytes, les cellules dendritiques, ainsi que les lymphocytes Natural Killer (NK). Les mécanismes humoraux impliquent de nombreuses molécules. Parmi celles-ci on retrouve le système du complément, composé de protéines. Le

système du complément possède trois voies d'activation (la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne), aboutissant à la formation d'un complexe d'attaque membranaire capable de lyser les micro-organismes infectieux. Le second groupe de molécules impliquées dans l'immunité innée sont les cytokines qui viennent cibler les cellules de l'immunité innée, les cellules endothéliales ou certains organes. Elles sont produites par toutes les cellules précédemment citées ainsi que les cellules endothéliales et épithéliales. Les cytokines (interférons (IFN), interleukines (IL), transforming growth factor (TGF) ;...) sont séparées en trois grandes catégories : les cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6, IL-12, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-1 ;...) les chimiokines (IL-8 ;...) et les cytokines régulatrices de l'inflammation (IL-10, TGF $\beta$ ,...). L'immunité innée passe aussi par la sécrétion d'enzymes et peptides antimicrobiens par les polynucléaires et les mastocytes, qui agissent directement sur les agents pathogènes (pour revue Marcelain et al. 2018).

Plusieurs éléments de l'immunité innée vont jouer un rôle important dans la protection de l'organisme face aux virus. C'est le cas des interférons de type I (IFN-1). Ils sont produits par les cellules infectées par des virus en réponse aux ARN viraux et par les cellules dendritiques plasmocytoïdes (dont l'origine est lymphoïde). Les INF-1 ont une activité antivirale en venant notamment interférer avec la production des virus, en inhibant la synthèse de leurs protéines, en limitant la pénétration des virus au sein des cellules, etc. Ils améliorent également la présentation d'antigène, activent les cellules NK et les lymphocytes B et prolongent la survie des lymphocytes T. Les cellules NK ont également un rôle clé dans la réponse innée antivirale en venant lyser les cellules infectées par les virus. Elles sécrètent également l'IFN $\gamma$  qui activent les macrophages, qui eux-mêmes produisent l'IL-12 activant les cellules NK, s'additionnant à l'activation par les IFN-I. Les cellules dendritiques vont conditionner la réponse adaptative afin de cibler les virus en activant et orientant les réponses B et T (pour revue Marcelain et al. 2018).

#### *2.2.2.1.2) Immunité adaptative*

A l'inverse de l'immunité innée, l'immunité adaptative est spécifique de l'antigène et elle est plus tardive. Elle est principalement cellulaire et ses cellules majeures sont les lymphocytes B et T. Ces lymphocytes sont porteurs d'un seul type de récepteur capable de reconnaître un antigène précis. Les lymphocytes B peuvent muter après activation en plasmocytes ou en cellules B mémoires. Les plasmocytes sont responsables de la réponse humorale via la production d'immunoglobulines (Ig). Les immunoglobulines sont des glycoprotéines capables de se lier

spécifiquement à un antigène via leur activité d'anticorps. Une immunoglobuline possède une partie constante, déclinée en 5 classes (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) et une partie variable, responsable de l'activité anticorps. Les lymphocytes T sont responsables de la réponse cellulaire (production de cytokines, organisation des réponses immunitaires, induction de l'apoptose). Les lymphocytes T sont séparés en deux grandes catégories : les lymphocytes T CD4+ et T CD8+. Les lymphocytes CD4+ se différencient après activation en lymphocytes auxiliaires (Th) ou lymphocytes régulateurs (Treg). Les lymphocytes T CD8+ évoluent après activation en lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. L'immunité adaptative est à l'origine d'une mémoire immunitaire permettant, en cas de seconde rencontre avec le même antigène, une réponse plus rapide et plus intense grâce à des lymphocytes mémoires. C'est ce même principe de mémoire immunitaire qui est exploité dans le cas de la vaccination (pour revue Marcelain et al. 2018).

L'immunité spécifique antivirale est caractérisée par la réponse humorale et la réponse T CD8+. Une réponse humorale rapide permet de neutraliser le virus en l'empêchant de se lier et de pénétrer au sein des cellules, en l'opsonisant ou en activant le système du complément. Cette réponse humorale précoce est possible grâce aux anticorps neutralisants, produits notamment lors de la vaccination. La réponse T CD8+ est importante dans l'immunité antivirale car ce sont les lymphocytes T CD8 cytotoxiques qui sont en mesure de détruire les cellules infectées par les virus. Leur activation passe par la production de cytokines par les lymphocytes Th1. Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques produisent également de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$ , participant à l'activité antivirale. Certains lymphocytes T CD8 spécifiques persistent après l'infection virale sous forme de lymphocytes T CD8+ mémoires. Ces lymphocytes seront activés en cas de nouveau contact avec l'antigène, permettant une réponse plus rapide (production de cytokines, prolifération,...) (pour revue Marcelain et al. 2018).

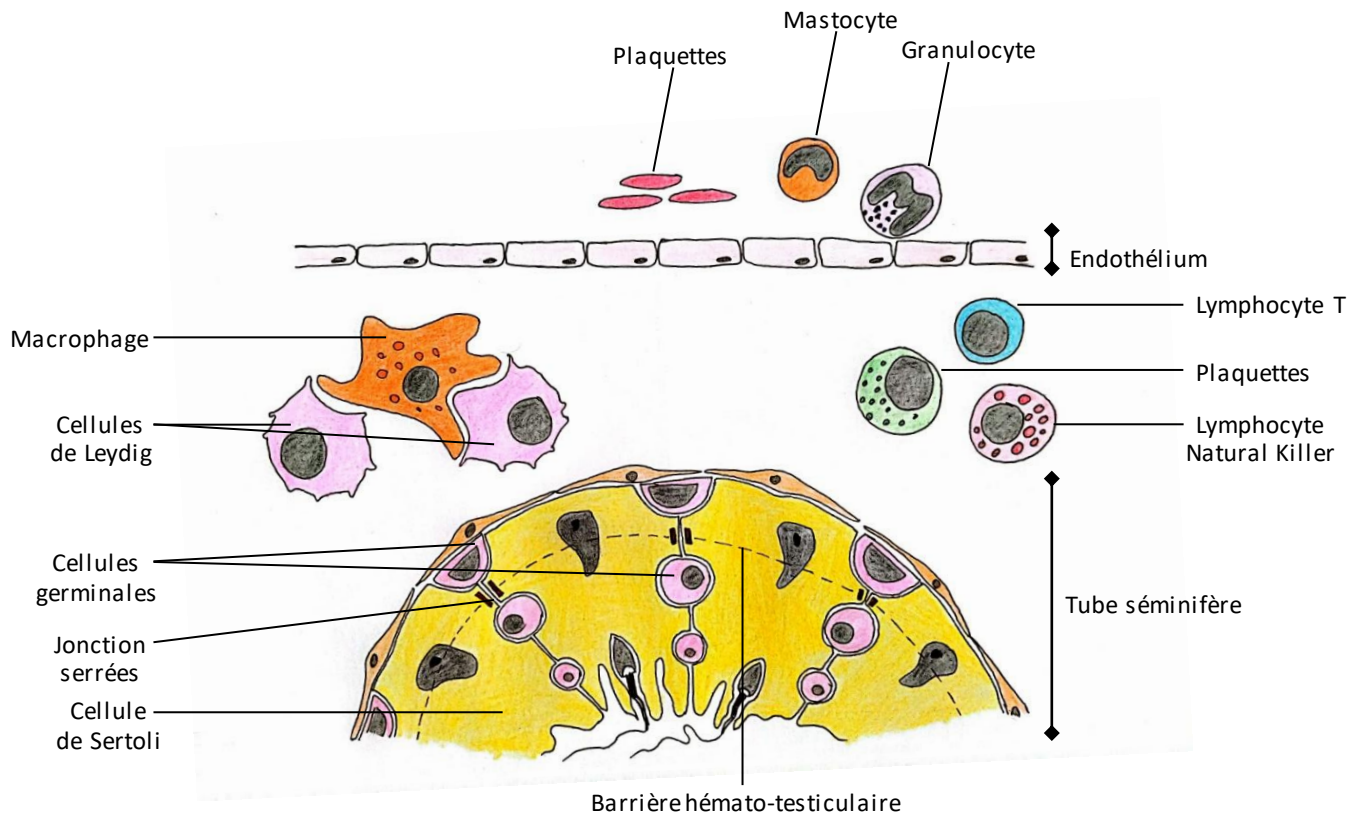
## **2.2.2.2) Immunité de l'appareil génital mâle**

### *2.2.2.2.1) Immunité du testicule*

La production de nouvelles cellules germinales à partir de la puberté est à l'origine de l'apparition de nouveaux antigènes, n'étant pas reconnus comme des antigènes du soi par le système immunitaire. Ainsi, en cas de rencontre entre les cellules immunitaires et ces antigènes, ils seront identifiés comme appartenant au non-soi et les cellules germinales seront détruites, aboutissant à terme à une infertilité. L'immunité testiculaire est donc en équilibre entre

l'élimination des agents pathogènes et la tolérance face aux antigènes des cellules germinales (Fijak, Bhushan, Meinhardt 2011).

L'immunité testiculaire et sa régulation sont associées à une barrière, appelée barrière hémato-testiculaire, présente au sein des tubes séminifères.



*Figure 9 : Compartimentation immunologique du testicule (réalisation personnelle, d'après Hedger 2015)*

#### 2.2.2.2.1.1) Barrière hémato-testiculaire

La barrière hémato-testiculaire est présente chez les Mammifères. Elle se situe vers la base des tubes séminifères, et divise ainsi l'épithélium en deux compartiments distinct : basal et adluminal (ou apical). Dans le compartiment basal vont être retrouvés les spermatogonies et certains spermatocytes, tandis que dans le compartiment adluminal se retrouvent les autres spermatocytes (primaire et secondaire) et les spermatides. La barrière hémato-testiculaire a alors pour rôle d'empêcher le contact entre les cellules germinales localisées dans le compartiment adluminal des tubes séminifères et les vaisseaux sanguins et lymphatiques (Mruk, Cheng 2015).

La barrière hémato-testiculaire est composée des cellules de Sertoli et comporte 4 jonctions cellulaires différentes : jonctions serrées, desmosomes, jonctions gap et spécialisation ectoplasmique, les plus importantes étant les jonctions serrées. Leur rôle est de permettre le

passage extrêmement sélectif de certaines molécules dans le compartiment adluminal (Mruk, Cheng 2015).

Cette barrière est en perpétuelle construction et déconstruction afin de permettre le passage des cellules impliquées dans la spermatogenèse du compartiment basal au compartiment adluminal, tout en maintenant un compartiment immunologique privilégié (Cheng, Mruk 2012).

#### **2.2.2.2.1.2) Système immunitaire du testicule**

L'immunité innée et l'immunité acquise jouent un rôle important dans l'immunité testiculaire. De nombreuses cellules immunitaires sont impliquées, dont le rôle est, dans les conditions physiologiques normales, de venir maintenir un environnement privilégié. Pour cela la suppression des cellules pro-inflammatoires ou la sécrétion de molécules anti-inflammatoires est hautement privilégiée. Plusieurs populations cellulaires se retrouvent autour des tubes séminifères, avec une activité permettant le maintien de cet environnement, telles que les macrophages, les lymphocytes, les cellules dendritiques, et les mastocytes. Cette immunité a surtout été étudiée chez l'Homme, lors d'études sur l'infertilité masculine.

Les macrophages testiculaires, comme les autres, sont séparés en deux catégories, une catégorie pro-inflammatoire (M1) et une catégorie anti-inflammatoire (M2). Cette deuxième catégorie est notamment caractérisée par sa haute production de cytokines anti-inflammatoires, notamment les interleukines 10 (IL-10) et les transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), production qui persiste même face à une stimulation pathogène. Mais les macrophages sont aussi capables de produire des cytokines pro-inflammatoires sous l'influence de facteurs de régulation négatifs, telles que les interleukines 1 bêta (IL-1 $\beta$ ) et TNF- $\alpha$  (Fang et al. 2021). De plus les macrophages testiculaires ont été identifiés dans des localisations précises au sein du testicule. Une première population se trouve dans le compartiment interstitiel, et leur origine serait embryonnaire, c'est-à-dire qu'ils ne dérivent pas de macrophages issus de la lignée sanguine et qu'ils sont présents dès la naissance. La seconde population a été identifiée dans le compartiment tubulaire, autour des tubes séminifères. Ces macrophages proviennent eux de la moelle osseuse et n'apparaissent qu'à partir de la puberté (Mossadegh-Keller et al. 2017). Ainsi le rôle du macrophage au sein du testicule n'est pas uniquement une régulation de l'immunité mais il a aussi un rôle dans l'organogenèse, dans la synthèse de testostérone et dans la spermatogenèse (Fang et al. 2021).



Les lymphocytes ayant un rôle dans l'immunité testiculaire sont notamment les lymphocytes T régulateurs (T-regs), qui inhibent l'action des lymphocytes T en conditions physiologiques et augmentent leur nombre en cas de réaction inflammatoire. L'apoptose des lymphocytes T est fréquemment induite au sein du testicule afin de conserver un environnement immunitaire favorable à la spermatogenèse. Les lymphocytes B quant à eux ne sont pas présents au sein des testicules dans les conditions physiologiques (Fang et al. 2021).

Les cellules dendritiques sont également présentes au sein des espaces interstitiels du testicule, sous forme immature. Leur nombre augmente et elles deviennent matures en cas de réaction inflammatoire. Elles diminuent les réactions auto-immunes en tolérant les auto-antigènes vis-à-vis des lymphocytes T (Fang et al. 2021).

Les mastocytes sont rencontrés en faible quantité en conditions physiologiques. Une augmentation de leur population a été corrélée à une altération de la spermatogenèse et les paramètres du sperme étaient améliorés en présence d'un bloqueur de mastocyte (Fang et al. 2021).

Les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli ont aussi un rôle dans l'immunité testiculaire. En effet, les cellules de Leydig produisent de la testostérone qui inhibe la réponse immunitaire face aux auto-antigènes et en cas d'invasion microbienne elles sécrètent des facteurs antiviraux (TNF- $\alpha$ , interféron  $\alpha$ ), des facteurs pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ ) ou des facteurs anti-inflammatoires (IL-6). Les cellules de Sertoli, en plus de leur rôle crucial dans la barrière hémato-testiculaire, sont en mesure de sécréter des cytokines, principalement anti-inflammatoires, mais dans certaines conditions des facteurs pro-inflammatoires peuvent aussi être produits (Fang et al. 2021).

#### *2.2.2.2) Immunité des voies spermatiques et de la prostate (pour revue Hedger 2015)*

L'immunité de l'appareil génital mâle appartient au système immunitaire des muqueuses. En effet la muqueuse tapissant les voies spermatiques est une frontière entre le milieu extérieur et l'organisme. Les cellules épithéliales possèdent des récepteurs pour les signaux de danger (Silva et al. 2020). Ce système immunitaire permet des interactions entre les antigènes et les cellules de l'immunité (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes,...). Il permet en même temps de conserver un certain degré de tolérance face aux divers antigènes, afin de ne pas initier de réaction allergiques. Contrairement à d'autres organes dont le système immunitaire muqueux est

plus développé et plus étudié, aucun tissu lymphoépithélial associé aux muqueuses (MALT) n'a été décrit au sein de l'appareil génital mâle, n'excluant toute fois pas l'existence de structures similaires ou analogues.

Au niveau de l'épithélium de l'épididyme se trouve une barrière hémato-épididymaire, qui semble moins imperméable que la barrière hémato-testiculaire. Cette barrière limite le passage des immunoglobulines dans la lumière de l'épididyme. De plus elle n'empêche pas la présence de macrophages et lymphocytes au sein de l'épithélium. Les cellules immunitaires qui y sont les plus fréquemment retrouvées sont les lymphocytes T CD8+, comme souvent dans les épithéliums muqueux. Chez la souris, des cellules dendritiques ont été identifiées au niveau de l'épithélium épididymaire. Les cellules immunitaires se trouvent dans l'ensemble de l'épididyme, mais leur nombre et activité sont plus marqués en région péritubulaire et au niveau de la tête qu'en région caudale. A l'inverse les cellules dendritiques intraépithéliales sont particulièrement actives au niveau de la tête de l'épididyme. Des barrières similaires à la barrière hémato-épididymaire se trouvent au niveau de l'ensemble des voies spermatiques et de la prostate (Shang et al. 2015). Au niveau du conduit déférent, de l'urètre et de la prostate, se trouvent principalement des lymphocytes T CD8+. Les macrophages sont plus rares au niveau épithélial, mais se retrouvent dans le stroma, y compris en conditions physiologiques non-inflammatoires.

Le système immunitaire (SI) regroupe l'ensemble des mécanismes (chimique et cellulaire) protégeant l'organisme en éliminant les constituants altérés ou les agents pathogènes. Il possède deux systèmes de défenses complémentaires : l'immunité innée et l'immunité acquise. Ces deux systèmes possèdent des acteurs adaptés à la lutte contre les bactéries et/ou virus.

L'appareil génital mâle est protégé des agents pathogènes par le SI, comme le sont tous les autres organes. Une grande partie de l'appareil génital s'inscrit dans l'immunité des muqueuses, du fait de son rôle d'interface et de barrière avec le milieu extérieur. A cette protection s'ajoute la nécessité d'une tolérance face aux antigènes des cellules germinales et des spermatozoïdes, au risque sinon d'entraîner leur destruction par le SI et une infertilité. Des barrières, composées de jonctions serrées, se retrouvent tout le long de l'appareil génital. La principale est la barrière hémato-testiculaire, permettant un passage ultra-sélectif d'éléments vers la lumière des tubes séminifères. Au sein des testicules le SI participe au maintien d'un environnement privilégié, avec un rôle anti-inflammatoire et

### **2.2.3) MODULATION DES INFECTIONS VIRALES PAR LE SPERME**

Comme présenté plus tôt dans cette partie, le sperme est composé d'une multitude de molécules et d'ions. Il est probable que certains de ces composés offrent une certaine protection aux spermatozoïdes face aux agents pathogènes. La question se pose alors de savoir si le sperme est en mesure d'interagir avec les virus qu'il rencontre et de quelle façon.

Nous verrons que le sperme ne représente pas seulement un vecteur potentiel de virus. Il joue aussi un rôle important dans l'inhibition ou au contraire l'exacerbation des infections virales. L'action du sperme sur les infections virales dépend de sa composition, du virus et probablement de l'espèce ciblée.

La quasi-totalité des études répertoriées et présentées ci-après portent essentiellement sur l'Homme. Le nombre de recherche reste néanmoins limité. Ainsi ce paragraphe fait le point sur les connaissances actuelles d'un effet modulateur du sperme ou du liquide séminal sur l'ensemble des virus, sans restreindre la recherche uniquement aux herpèsvirus.

### 2.2.3.1) Inhibition des infections virales par le sperme

Chez l'homme, plusieurs facteurs d'inhibition virale, variables selon le virus étudié, ont pu être identifiés. Les études initiales portent surtout sur l'interaction entre le sperme et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), dont la transmission par le sperme est l'une des voies de contamination majeure. Ainsi, il a été montré que certains peptides, dérivés de la séménogéline et faisant partis de la fraction des polypeptides cationiques du liquide séminal, ont une action inhibitrice de l'activité du VIH (Martellini et al. 2009). Egalement, les exosomes, petites nanovésicules extracellulaires contenant diverses molécules que l'on retrouve dans le sperme, sont inhibiteurs de l'infection par le VIH (Ouattara, Anderson, Doncel 2018).

L'interaction virus et sperme a également permis de montrer l'existence d'un composé présent dans le liquide séminal, provenant probablement du liquide prostatique, qui possède un effet antiviral actif sur plusieurs virus, dont le virus ourlien, responsable de la maladie des oreillons et les **herpèsvirus simplex humain** (Chen et al. 2021). Une étude approfondie du liquide prostatique met en évidence qu'il possède un composé cytotoxique et un autre composé, cette fois-ci virucide. L'action combinée de ces deux composés permet une inhibition plus importante de l'infection des cultures cellulaires par le virus ourlien (Wang et al. 2024).

En ce qui concerne le **cytomégalovirus** humain, le liquide séminal inhibe l'activité du virus, avec une action dose-dépendante et une légère variation selon le donneur de sperme. Il semblerait que le liquide séminal empêche l'adhésion des virions aux cellules, en interagissant avec certaines glycoprotéines (Lippold et al. 2019).

Le sperme limite l'infection des cellules par le virus Zika (ZIKV) en inhibant son adhésion aux cellules. Cette inhibition serait due à des vésicules extracellulaires, contenant notamment des protéines et des acides nucléiques, produites par les cellules de l'appareil génital et sécrétées dans le liquide séminal (Müller et al. 2018; Wang et al. 2020). L'étude du contenu de ces vésicules montre qu'il s'agit de la fraction lipidique qui possède cette action antivirale (Wang et al. 2020).

La capacité d'inhibition virale a également été étudiée chez le bovin. Deux études se sont intéressées à la protéine PDC-109, l'une des protéines du plasma séminal. Cette protéine inhibe la fusion du virus de l'influenza avec les membranes des érythrocytes et diminue l'infection de cultures cellulaires de cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) (Welke et al. 2019). Cette

protéine est également en mesure d'inhiber d'autres virus comme le SARS-COV-2, et également les infections médiées par la glycoprotéine VSV (Sperber et al. 2022).

### **2.2.3.2) Stimulation des infections virales par le sperme**

Chez l'homme, la phosphatase acide prostatique (PAP) est un marqueur prostatique, naturellement présent dans le sperme, qui forme des fibrilles amyloïdes. Ces fibrilles ont été renommées « semen-derived enhancer of virus infection (SEVI) », qui peut se traduire par facteur dérivé du sperme d'amélioration d'infection virale. En effet, il a été montré qu'elles facilitaient l'attachement du VIH à ses cellules cibles (Münch et al. 2007).

La séménogéline est une protéine présente en grande quantité dans le sperme, qui associée aux protéines de fibronectine forme le coagulum spermatique. Sous l'action d'enzymes, cette protéine est décomposée en plusieurs fragments, qui forment des fibrilles amyloïdes (SEM amyloïdes). Ces fibrilles présentent les mêmes caractéristiques que les fibrilles SEVI, et stimulent l'infection virale du VIH en facilitant l'attachement et l'entrée dans les cellules cibles des virions (Roan et al. 2011).

Le liquide séminal, les fibrilles SEVI et SEM stimulent également l'infection par le HCMV et le cytomégalovirus murin, en augmentant le taux d'infection et la vitesse de réplication du virus (Tang, Roan, Yamamura 2013). De même, l'infection par le **HSV-1 et HSV-2** est facilitée par le liquide séminal et les fibrilles SEVI et SEM, avec également une augmentation du taux d'infection et de la vitesse de réplication (Torres, Ortiz, Tang 2015). Il a également été montré que les fibrilles SEVI stimulaient l'infection des cellules par le virus Ebola (Bart et al. 2018).

Le sperme n'est pas uniquement un vecteur viral, il semble avoir également un rôle clé dans la modulation des infections et de la transmission des virus. Il est en mesure d'inhiber, du moins en partie, l'activité de certains virus, dont notamment des herpèsvirus. Mais certains composés du sperme ont montré un potentiel d'exacerbation des infections virales.

Cet effet modulateur a été exploré chez l'Homme principalement, un peu chez le bovin, mais il n'a pas été étudié chez le chien. Il est possible que certains composés du sperme canin soient similaires à ceux rencontrés chez l'Homme et qu'un tel effet modulateur puisse être retrouvé chez le chien, et on ne peut exclure à ce stade de nos connaissances très fragmentaires que le sperme canin puisse stimuler ou inhiber les infections au CHV-1.

Ces hypothèses renforcent l'importance de disposer d'outils efficaces pour détecter le CHV-1 dans le sperme canin et approfondir notre compréhension de l'interaction sperme-virus.

## **2.3) OUTILS DE RECHERCHE DE VIRUS DANS LE SPERME : AVANTAGES ET LIMITES**

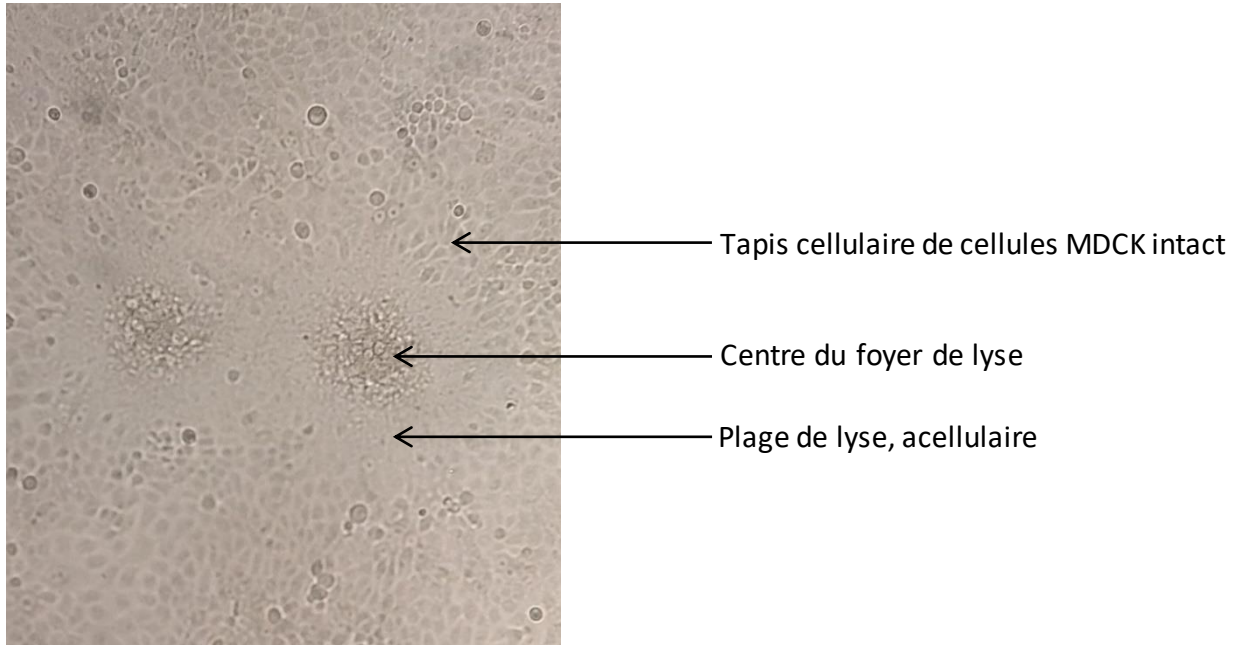
Il existe différentes méthodes possibles pour identifier la présence de virus dans un échantillon. Certaines méthodes permettent la mise en évidence directe du virus, par la détection des virions, des protéines virales ou encore des séquences nucléiques virales. D'autres méthodes permettront d'identifier la présence du virus indirectement.

### **2.3.1) TECHNIQUES DE MISE EN EVIDENCE DE VIRIONS ET PROTEINES VIRALES**

#### **2.3.1.1) Isolement viral**

L'isolement viral consiste à infecter des cellules en culture avec le virus étudié afin qu'il puisse s'y multiplier. Certains virus en se multipliant vont induire un effet cytopathique sur les cultures cellulaires, dont les caractéristiques peuvent être spécifiques du virus. Il est nécessaire d'avoir une lignée cellulaire qui soit permissive au virus étudié, c'est-à-dire que le virus puisse s'y multiplier (Voevodin, Marx 2009). Cette approche peut être appliquée au sperme. Elle a l'avantage de déterminer la présence de virions infectieux, mais l'inconvénient de nécessiter un délai important pour avoir un résultat fiable.

De plus, le sperme est souvent cytotoxique à dose élevée pour les cultures cellulaires. Une dilution préalable est donc souvent nécessaire afin de limiter cet effet. Cette approche est déjà utilisée pour certains herpèsvirus. Dans le cadre de l'isolement du BoHV-1, l'OIE recommande de diluer le sperme, puis de l'incuber pendant une heure avant de laver les tapis cellulaires. Ceux-ci sont ensuite placés à l'étuve pendant plusieurs jours, avec une observation régulière pour détecter l'effet cytopathique (World Organisation for Animal Health 2017).



*Figure 10 : effet cytopathique du CHV-1 sur un tapis de cellules MDCK*

### **2.3.1.2) Immunofluorescence directe et indirecte**

L'immunofluorescence repose sur la détection des antigènes viraux. Pour cela des anticorps spécifiques de l'antigène recherché sont nécessaires. Pour que la liaison de l'anticorps sur l'antigène soit visible, un marqueur fluorescent est couplé à l'anticorps. Ce marqueur est soit directement lié à l'anticorps, on parlera alors d'immunofluorescence directe, soit lié à un réactif secondaire, un deuxième anticorps spécifique de l'anticorps précédemment ajouté, et on parlera d'immunofluorescence indirecte (Voevodin, Marx 2009). Les échantillons sont ensuite observés au microscope à fluorescence.

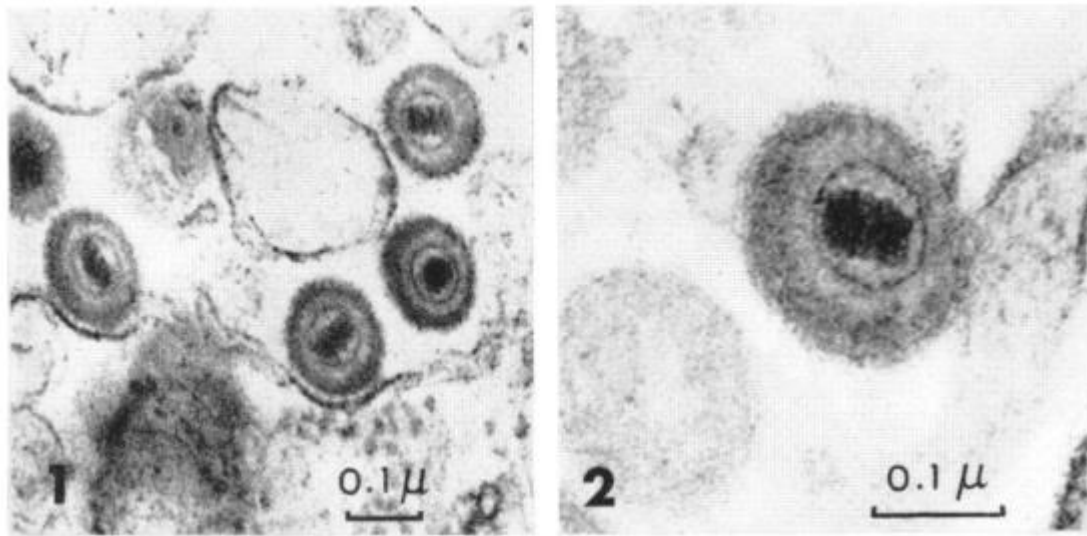
L'immunofluorescence directe manque souvent de sensibilité, tandis que l'immunofluorescence indirecte, bien que plus sensible, elle plus longue à mettre en place (World Organisation for Animal Health 2017). Ces techniques permettent d'identifier les antigènes viraux, mais n'apporte pas d'information sur la réplication du virus.

### **2.3.1.3) Microscopie électronique**

La microscopie électronique (ME) remplace l'utilisation de la lumière de la microscopie optique par un faisceau d'électrons. Le faisceau est focalisé grâce à des électroaimants. Le pouvoir de résolution de la ME est nettement supérieur à celui d'un microscope optique, pouvant grossir



jusqu'à  $10^7$  fois l'élément ciblé (Payne 2023). Des virus peuvent ainsi être visualisés directement dans des cellules infectées.



*Figure 11 : Virions du CHV-1 observés au microscope électronique (Strandberg, Carmichael 1965)*

Plusieurs préparations en amont de l'observation au ME peuvent être réalisées. Les échantillons peuvent être traités par coloration négative. Il s'agit d'une couche de métal lourd qui recouvre l'échantillon. Cela permet d'augmenter le contraste autour des particules virales. Une coupe ultrafine des échantillons permet la visualisation des structures internes des cellules et des virus. Les échantillons sont fixés, incorporés dans de la résine puis découpés à l'aide d'une lame en diamant et d'un microtome. Les lamelles obtenues sont ensuite placées sur une grille. Des colorants denses aux électrons peuvent être appliqués par-dessus pour augmenter le contraste (Hazelton, Gelderblom 2003; Payne 2023).

Les images sont rapides d'obtention et permettent une reconnaissance rapide du virus. Elles permettent également de localiser les particules virales par rapport aux cellules. Mais cela nécessite une concentration suffisante de particules virales, car la quantité d'échantillon déposée lors de l'observation est très faible. De plus les échantillons biologiques sont fortement endommagés par le faisceau d'électron lors de l'observation (Hazelton, Gelderblom 2003; Payne 2023). Enfin le principal inconvénient de cette technique est le coût du matériel et sa disponibilité. Cette technique n'est pas utilisable en routine.

## **2.3.2) TECHNIQUES DE DETECTION DES ACIDES NUCLEIQUES VIRAUX**

### **2.3.2.1) Analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) des herpèsvirus**

L'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction repose sur l'utilisation d'enzymes de restriction pour venir en des sites spécifiques découper l'ADN viral. Ces segments d'ADN sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN viral sera alors représenté par un nombre défini de fragments de différentes tailles connues. Cette technique permet d'identifier un virus dans un échantillon si sa cartographie par enzyme de restriction est connue. Elle permet également de comparer deux virus, car des variations du génome peuvent être présentes entre deux virus de la même souche ou d'un isolat apparenté.

Les RFLP sont un outil utile pour les études épidémiologiques. De plus elles sont moins coûteuses que les techniques de séquençage et faciles à réaliser. En contrepartie, elles sont moins puissantes que les techniques de séquençage modernes (World Organisation for Animal Health 2021). Cette technique est moins sensible que la PCR, et elle n'est désormais retrouvées presque que dans des publications assez anciennes, elle n'est plus utilisée en routine.

### **2.3.2.2) PCR**

#### *2.3.2.2.1) Principe de la PCR*

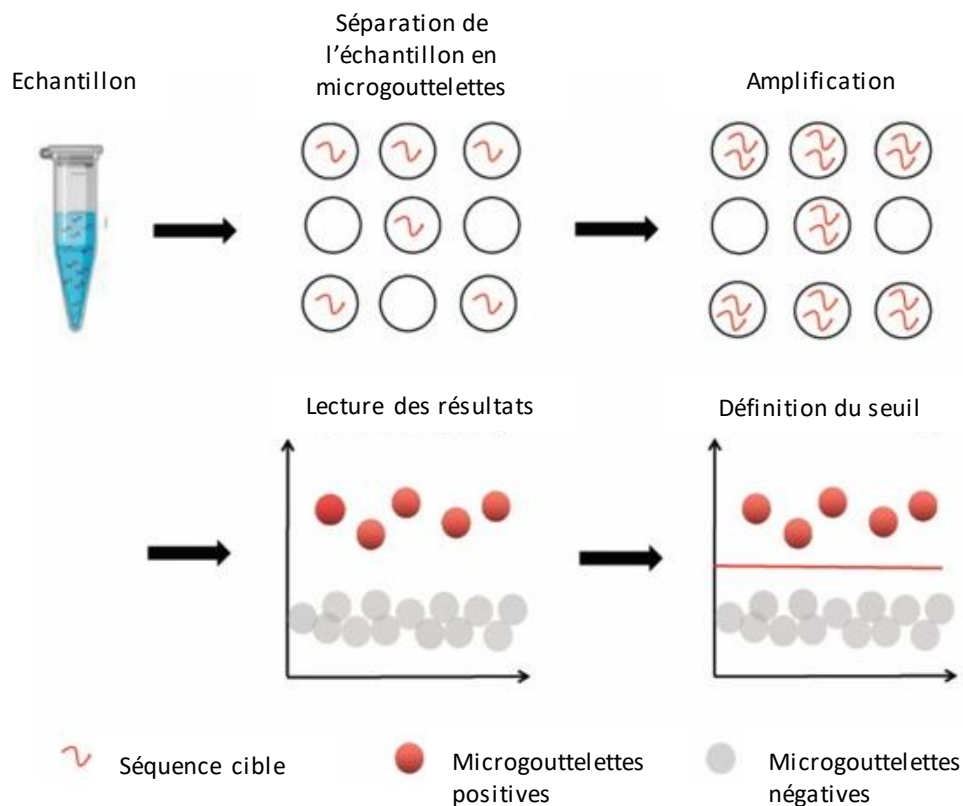
La réaction en chaîne par polymérase ou PCR utilise des amorces d'oligonucléotides spécifiques du virus recherché, impliquant donc la nécessité de connaître la séquence du génome du virus. Une ADN polymérase thermostable permet de synthétiser une copie de l'ADN cible. L'échantillon subit ensuite plusieurs cycles comprenant : une phase à haute température permettant une dénaturation de l'ADN double brin nouvellement formé, puis une phase permettant une nouvelle hybridation des amorces sur les brins d'ADN et enfin une phase de multiplication de l'ADN via l'ADN polymérase. Le nombre de molécule d'ADN double à chaque phase. D'ordinaire entre 30 et 40 cycles sont effectués (Payne 2023).

Il existe plusieurs types de PCR :

- La PCR classique : les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse. Elle est qualitative (Payne 2023).

- La PCR nichée : elle consiste en une seconde amplification après une première amplification selon le schéma d'une PCR classique. Pour cela un second couple d'amorce est utilisé, ciblant cette fois-ci une séquence « interne » de l'ADN cible. Cette technique permet d'augmenter la sensibilité de l'analyse mais augmente aussi le risque de contamination et le temps de manipulation (Lemée, Gueudin, Pillet 2022). Elle est de moins en moins utilisée et est remplacée par la PCR en temps réel.
- La PCR en temps réel : un produit intercalant fluorescent de l'ADN est utilisé. Ce produit est peu fluorescent jusqu'à ce qu'il soit intercalé entre deux brins d'ADN. Ainsi la fluorescence émise augmente en même temps que la concentration d'ADN. La fluorescence est mesurée au cours de la PCR. La PCR en temps réel en semi-quantitative, sauf si on compare le résultat avec un échantillon dont la concentration initiale est connue, dans ce cas l'analyse sera quantitative (Payne 2023) (voir paragraphe 3.1.7). Cette technique a l'avantage par rapport à la PCR classique de ne pas avoir d'étape d'électrophorèse supplémentaire. Elle apporte également des informations sur la quantité d'ADN initial dans l'échantillon.
- La PCR quantitative Taqman : cette méthode utilise une sonde spécifique oligonucléotidique marquée par deux fluorophores. Le premier, fixé à l'extrémité « 3' » et dit « quencher », vient inhiber l'émission de fluorescence du second fluorophore dit « reporter », fixé à l'extrémité 5'. La fluorescence est émise lorsque cette sonde est dégradée par le passage de la polymérase. Ainsi la fluorescence augmente en même temps que la concentration d'ADN dans l'échantillon.
- La PCR multiplexe : elle permet d'amplifier simultanément différentes cibles à partir du même prélèvement. Elle est utile dans la recherche de plusieurs pathogènes (Lemée, Gueudin, Pillet 2022).
- La PCR digitale en gouttelette (ddPCR) : elle utilise les mêmes amorces que la PCR en temps-réel, mais est plus sensible. Le mélange réactionnel est séparé en une multitude de microgouttelettes d'eau en suspension dans de l'huile. Chaque microgouttelette contient soit une molécule d'ADN, soit aucune, en suivant une distribution de Poisson. L'amplification va se dérouler dans chacune des gouttelettes contenant une molécule d'ADN cible. Chaque gouttelette est ensuite analysée afin de savoir si elle est positive ou négative. Cette technique permet une

quantification absolue (Chen et al. 2021). Elle reste peu utilisée en routine pour l'instant.



*Figure 12 : Principe de la ddPCR (Chen et al. 2021)*

La PCR permet de mettre en évidence la présence d'ADN viral ou de fragment d'ADN, mais ne garantit pas la présence de virions intègres ou en phase de réplication. Néanmoins, la PCR peut être adaptée à la recherche d'ARN, témoin de la présence du virus actif dans le cycle de multiplication. Pour cela une étape précédant la PCR est nécessaire, afin de convertir cet ARN en ADN complémentaire. Cette étape s'appelle la rétro-transcription (RT) (Lemée, Gueudin, Pillet 2022).

La PCR est un outil diagnostique sensible, permettant de cibler un groupe de virus liés, ne reconnaissant des séquences communes ou au contraire de cibler un virus particulier si les amorces ciblent une séquence spécifique. La PCR multiplexe permet de rechercher plusieurs virus au cours d'une même analyse, diminuant ainsi le coût de la recherche. Les produits de la PCR peuvent par la suite être séquencés, permettant ainsi de valider les résultats obtenus et d'apporter de nouvelles informations sur le génome du virus étudié. La PCR en temps réel permet

d'obtenir des résultats semi-quantitatifs ou quantitatifs, ce qui permet de comparer des échantillons selon leur concentration ADN viral initial. L'ensemble de la procédure est automatisée, permettant un gain de temps. Enfin la PCR permet l'analyse simultanée de nombreux échantillons (Payne 2023).

La PCR permet un réel gain de sensibilité lorsque l'échantillon contient du sperme par rapport à l'isolement viral. En effet, comme vu précédemment, l'isolement de virus à partir de sperme peut être limité du fait de la cytotoxicité de ce dernier pour les cultures cellulaires. De plus les analyses PCR sont plus rapides, très spécifiques et plus sensibles que l'isolement viral (van Rijn et al. 2004). De même, la PCR est plus facile et plus rapide d'exécution que l'immunofluorescence. Elle permet également de travailler avec des échantillons liquides.

Donc globalement la PCR, en particulier temps réel, présente de très sérieux avantages pour la détection du CHV-1 dans le sperme des mâles. Néanmoins cet échantillon est particulièrement riche et complexe et pourrait contenir des substances susceptibles d'interférer négativement avec la PCR.

#### *2.3.2.2.2) Risque d'inhibition de la PCR par le sperme*

Le sperme, comme les fèces, est susceptible de contenir des inhibiteurs de la PCR. Ces inhibiteurs peuvent empêcher la PCR de se dérouler correctement et ainsi être à l'origine de faux-négatifs (World Organisation for Animal Health 2014). Il est important de venir vérifier l'existence d'un tel phénomène pour que les résultats obtenus avec la PCR soient valides (Bustin et al. 2009). La nature de ces inhibiteurs dans le sperme n'est pas parfaitement identifiée. L'urée, les hèmes, l'héparine et les immunoglobulines G sont des inhibiteurs rencontrés fréquemment dans les tissus et fluides biologiques (Nolan et al. 2006). Dans le sperme sont notamment suspectés : la lactoferrine, les peroxydes et les résidus contenant du zinc, comme étant les principales substances à interagir avec la Taq polymérase (Bourlet et al. 2003). De plus il semblerait que ce soit surtout la fraction séminale qui contiendrait cet effet inhibiteur (Semprini et al. 1998; Debono et al. 2000). Il est donc possible de culotter et d'extraire les spermatozoïdes afin d'éliminer la fraction séminale.

L'objectif de ce paragraphe est de faire le point sur les techniques utilisées pour contrôler l'effet inhibiteur du sperme sur la PCR ou pour éliminer les inhibiteurs de l'échantillon analysé, notamment lors d'analyse portant sur la recherche d'herpèsvirus dans le sperme. Cet effet

inhibiteur n'ayant pas été étudié à ce jour chez le chien, nos recherches se baseront sur les éléments disponibles chez d'autres espèces. Il a été mis en évidence notamment chez l'Homme (Semprini et al. 1998) et le bovin (Wang et al. 2007). A l'inverse, il n'a pas été retrouvé chez le cheval (Hebia-Fellah et al. 2009) ni chez le porc (Teankum et al. 2006; Pal et al. 2008).

Afin de vérifier et de contrôler cette inhibition l'organisation mondiale de la santé animale (WOAH) propose deux axes (World Organisation for Animal Health 2014) :

- L'utilisation d'un **contrôle interne** : une portion d'ADN, de taille ou de séquence différente de l'ADN cible mais pouvant être ciblé par les mêmes amorces, est ajoutée à l'échantillon analysé. Ce témoin peut être ajouté en une concentration précise et connue, permettant d'évaluer la présence d'inhibiteurs. Cette technique en contrepartie peut entraîner une compétition pour les amorces entre le témoin et l'ADN cible et nécessite d'avoir accès à la portion d'ADN à ajouter.
- **L'amplification d'un gène domestique ou structurel** : le gène ciblé doit être un gène naturellement et toujours présent dans l'échantillon. En cas d'inhibition de la PCR, l'amplification de ce gène sera également limitée. L'inconvénient étant que le gène domestique est parfois présent en quantité suffisante pour être amplifié malgré l'inhibition de la PCR, a contrario de l'ADN cible qui, notamment dans le cas d'ADN viral, est souvent présent en faible quantité.

Au cours des études portant sur la présence de virus dans le sperme du taureau, différentes stratégies ont été mises en place pour limiter ce risque d'effet inhibiteur.

Van Engelenburg et al dans l'étude de BoHV-1 dans le sperme de taureau utilisent un **contrôle interne co-amplifié avec l'ADN** de BoHV-1. Il s'agit d'un plasmide contenant une région pouvant être ciblée par les amorces et dont le produit d'amplification est d'une longueur connue (278 pb) (van Engelenburg et al. 1993).

Par la suite les étapes d'extraction d'ADN sont associées à l'objectif **d'éliminer le plus d'inhibiteurs possible** à cette étape. Pour cela Da Silva et al passent le liquide séminal infecté par le virus BVDV à travers **une colonne de chromatographie Sephacryl S-400**, et centrifuge l'ensemble à 1000 g pendant 2 minutes à température ambiante. En comparaison des autres techniques essayées au cours de l'étude (utilisation d'une colonne Chelex-100 pour l'extraction d'ARN, chromatographie Sephadex-G50, solvants phénols, et ajout de d'albumine de sérum bovin)

il s'agit de celle qui a éliminé les inhibiteurs contenus dans le sperme le plus efficacement (Da Silva et al. 1995). Cette technique a également été appliquée pour l'analyse de BoHV1 dans le sperme de taureau (Rocha et al. 1998).

A l'inverse Wang et al utilisent une **résine chélatrice (Chelex 100)**, qui est montrée comme plus efficace que l'extraction à base de solvant utilisant du phénol et du chloroforme ou que l'extraction avec des mini-colonnes disponibles dans le commerce. Cette extraction est couplée avec l'utilisation d'un **contrôle interne** de type gène domestique. Il s'agit de la réalisation d'une analyse PCR en temps réel du gène de l'hormone de croissance bovine (bGH), réalisée soit dans un tube séparée de l'analyse pour BoHV-1 soit réalisée lors d'une PCR multiplexe (Wang et al. 2007; 2008).

Rana et al combinent l'utilisation d'un **contrôle interne** de type plasmide contenant une séquence connue et détectée par les amorces, à **une deuxième analyse des échantillons sortant négatifs en PCR**. Ces échantillons sont contaminés avec du virus puis repassé en PCR. S'ils sortent positifs en PCR cela implique l'absence d'inhibiteur dans l'échantillon et qu'il s'agit de vrais négatifs. A l'inverse un résultat négatif implique la présence d'inhibiteurs de la PCR, et la présence ou l'absence de virus de ces échantillons ne peut être garantie (Rana et al. 2011).

Enfin dans les études plus récentes la **ddPCR** semble plus sensible et moins sujette au phénomène d'inhibition par le sperme que la PCR classique ou la PCR en temps réel (Taylor, Laperriere, Germain 2017; Yu et al. 2022).

Chez l'Homme cet effet inhibiteur est aussi décrit. Notamment, Debono et al ont mis en évidence cet effet en ajoutant au liquide séminal et aux spermatozoïdes une quantité connue d'ARN du virus de l'hépatite C (HCV). Les échantillons ont ensuite été analysés en PCR. Les échantillons étaient quasiment tous négatifs pour le liquide séminal (6/7) mais étaient tous positifs pour les spermatozoïdes (Debono et al. 2000). Les inhibiteurs sont donc principalement contenus dans le liquide séminal, et l'analyse des culots de spermatozoïdes est peu sujette au risque d'inhibition.

Dans leur étude portant sur la présence du virus de l'hépatite C dans le sperme humain Semprini et al ont utilisé deux méthodes pour contrôler un éventuel effet inhibiteur du sperme sur la PCR. Ils ont réalisé une **deuxième analyse de leurs échantillons négatifs en PCR**, comme décrit précédemment pour Rana et al. Pour cela, un sérum positif en ARN viral dont la concentration est connue est ajouté aux échantillons négatifs. L'ensemble est de nouveau analysé en PCR. Si l'ARN

viral est détecté lors de cette deuxième analyse, cela témoigne de l'absence d'inhibition et que l'échantillon était bien négatif initialement. Si l'ARN viral n'est pas détecté alors il y a la présence d'une inhibition de la PCR et le résultat de la PCR ne peut être interprété. De plus l'ARN de la  $\beta$ -actine est amplifié et analysé par PCR, il s'agit du **contrôle interne** (Semprini et al. 1998).

Cassuto et al ont cherché à mettre au point une technique d'extraction de l'ARN du HCV dans le sperme qui limiterait l'effet inhibiteur de ce dernier sur la PCR. Pour cela 4 étapes du protocole d'extraction fourni par le fabricant ont été modifiées, à chaque fois contrôlées grâce à l'ajout d'un contrôle interne dont la nature n'est pas renseignée. Ces étapes consistent en une **dilution** au 1/3 de l'échantillon de départ, une **centrifugation** à 28 000 g pendant 1 h de l'échantillon, une **augmentation du volume du tampon de lyse** et enfin un **mixage** de 10 s et une nouvelle **centrifugation** du culot à 28 000 g à 8°C pendant 5 minutes avant analyse PCR. Ces modifications ont permis d'obtenir une sensibilité en présence de liquide séminal équivalente à celle en présence de sérum (Cassuto et al. 2002).

Différentes techniques d'extraction d'ARN ont été comparées par Bourlet et al dans le but de valider l'utilisation de techniques initialement conçues pour réaliser des extractions sur sang, dans le cadre de mise en évidence de l'ARN du HCV dans le sperme humain. Cette étude montre qu'une **étape de centrifugation préalable à l'extraction d'ARN** améliore le résultat, de même qu'une **dilution de l'échantillon**, et que l'exactitude des résultats varie selon le kit d'extraction utilisé (Bourlet et al. 2003).

Pasquier et al ont pu mettre au point une technique automatisée de PCR en temps réel pour la détection et la quantification du HIV et du HCV dans le sperme qui ne présente pas d'inhibition. L'extracteur **Ampliprep™** est utilisé et **le sperme est dilué 2 fois avec du plasma sanguin** négatif aux virus concernés (Pasquier et al. 2006).

Par la suite (années postérieures à environs 2006) la mention d'inhibiteurs dans le sperme de l'homme disparaît des publications.

Ainsi, différentes stratégies ont été développées pour contrôler la présence d'inhibiteur et s'assurer de la fiabilité des résultats : ajout d'un contrôle interne co-amplifié par les amorces ou amplification d'une séquence déjà présente dans l'échantillon en parallèle ou encore une seconde analyse des échantillons négatifs avec l'ajout d'une quantité connue d'acide nucléique cible. D'autres recherches ont porté sur la diminution voire l'élimination de ces inhibiteurs du sperme. La dilution préalable des échantillons avant extraction d'ADN ou ARN a fréquemment montré son



intérêt. De même l'utilisation de colonne de chromatographie Sephacryl lors de l'extraction semble efficace.

### 2.3.2.3) Technique d'amplification isotherme médiée par boucle

La technique d'amplification isotherme médiée par boucle (LAMP) permet une amplification de l'ADN dans des conditions isothermes. Elle allie une ADN polymérase et quatre amorces spécifiques, reconnaissant 6 séquences distinctes de l'ADN cible. La réaction cyclique produit des structures en tige-boucle par synthèse d'ADN avec déplacement de brin. En moins d'une heure la réaction produit jusqu'à  $10^9$  copies de la séquence cible. Les produits finaux sont des ADN en tige-boucle avec plusieurs répétitions inversées de la cible et des structures en « chou-fleur » avec plusieurs boucles formées par appariement entre répétitions alternativement inversées de la cible sur un même brin (Notomi et al. 2000). Les résultats peuvent être visualisé à l'œil nu ou sur gel d'agarose (Pawar et al. 2014).

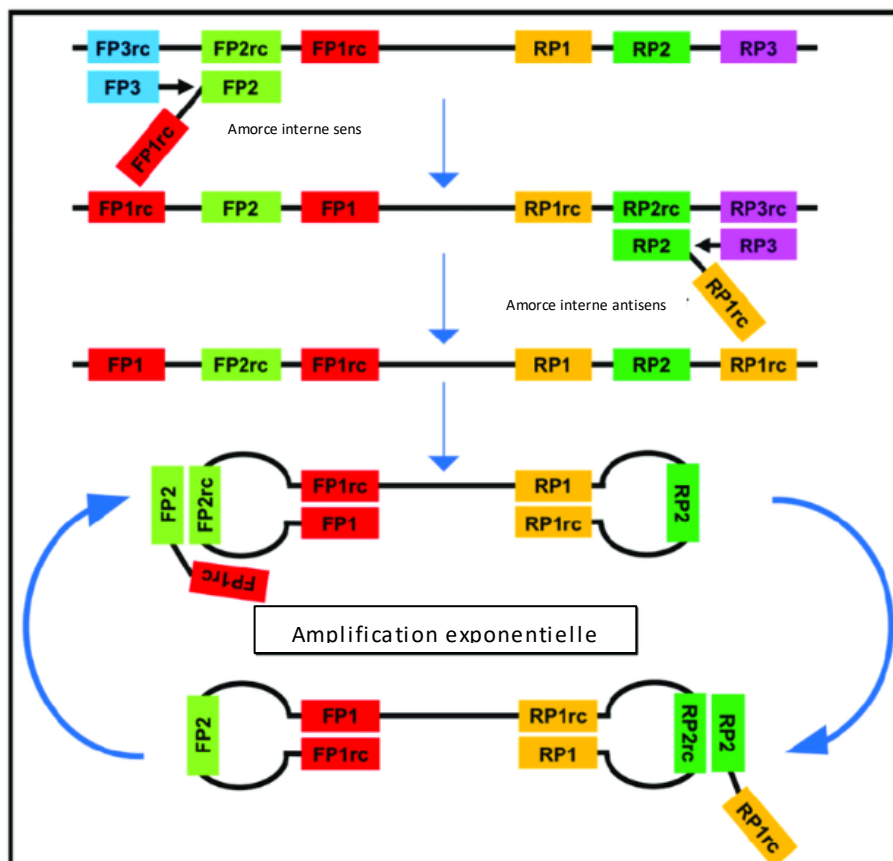


Figure 13 : Principe de la méthode LAMP (Hansen, Abd El Wahed 2020)

Cette méthode est très spécifique, efficace et rapide, en condition isotherme. Un thermocycleur n'est donc pas nécessaire. La méthode est peu coûteuse et relativement facile pour

le manipulateur. Néanmoins il existe un risque d'amplifications non spécifiques qui créent un bruit de fond, pouvant compliquer l'interprétation des résultats (Notomi et al. 2000; Pawar et al. 2014). Cette méthode a été validée pour la détection de BoHV-1 dans le sperme du taureau (Pawar et al. 2014).

Une variante de la LAMP utilise des microcapillaires, la « microcapillary LAMP ( $\mu$ LAMP). Elle permet d'utiliser de très faibles volumes. La miniaturisation du matériel nécessaire permet également une utilisation sur le terrain, avec notamment la mise en évidence de BoHV-1 dans le sperme du taureau (Ali et al. 2022).

#### **2.3.2.4) Hybridation in situ**

L'hybridation in situ (ISH) utilise des sondes ADN ou des ARN simples brins, produites de façon à compléter une courte région spécifique du génome viral. Ces sondes sont couplées à des marqueurs visibles au microscope (World Organisation for Animal Health 2021). Cette technique permet de localiser le virus sur coupe cellulaire. Elle peut donc être utilisée pour identifier précisément les cellules hôtes du virus au sein de l'appareil génital mâle.

Lorsque la sonde possède un marqueur fluorescent on parle d'hybridation in situ en fluorescence (FISH). Cette technique permet notamment d'identifier le génome viral une fois celui-ci intégré dans le génome des cellules, dont les spermatozoïdes (Han et al. 2024).

Cette méthode permet de localiser le virus dans les tissus, et notamment au sein de l'appareil génital. De plus, elle a longtemps été considérée comme la méthode de choix pour la détection de l'EBV dans les tissus (Weiss, Chen 2013). Néanmoins elle n'est pas utilisée dans le sperme.

#### **2.3.1.5) Techniques haut-débit multicibles**

Les techniques haut-débit multicibles permettent d'identifier de nombreuses cibles simultanément. Ces techniques sont parmi les plus récentes et ne sont pas encore utilisées en routine en virologie.

L'utilisation des puces à ADN (ou microarrays) fait partie de ces techniques. Elle consiste à fixer sur une surface solide, appelée « puce », des milliers à millions de fragments d'acides nucléiques. La puce est ensuite exposée à l'ADN ou ARN de l'échantillon étudié. L'appariement des

bases entre la puce et l'échantillon produit une lumière par fluorescence (National Human Genome Research Institute 2024). Cette technique permet d'analyser la présence de plusieurs virus simultanément (Kaspersen et al. 2012). Notamment Wang et al ont utilisé cette méthode afin d'analyser des prélèvements nasaux chez le chiens, et ont notamment pu mettre en évidence la présence du CHV-1 dans ce prélèvement (Wang et al. 2017). Cette technique est aussi utilisée sur le sperme, notamment pour analyser certaines variations liées à une infection virale chez le porc (Calcaterra, Reicks, Pratt 2018). Cette technique n'est pas utilisée en routine dans la recherche de virus, mais plutôt utilisée pour l'analyse et la comparaison des génomes : détection des mutations, analyse de l'expression génique, génotypage...

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) permet de séquencer l'ensemble du génome, du transcriptome et de l'épigénome, et permet d'obtenir le profil transcriptionnel complet de l'échantillon. Cette technique permet de mieux comprendre le fonctionnement de certains gènes et de progresser dans la compréhension de la pathogénicité des virus. Notamment cette technique a été utilisée pour étudier les herpesvirus et leur latence (Strahan, Uppal, Verma 2016). Elle est aussi appliquée à l'analyse du microbiome présent dans le sperme de l'homme (Davies, Minhas, Jayasena 2023). Cette technique est très complexe de par le volume de données et la complexité de l'analyse. L'équipement représente également un coût important. Cette technique est donc peu utilisée en routine.

Parmi les différentes techniques disponibles pour l'analyse de virus dans le sperme, la PCR reste la technique la plus couramment utilisée, du fait de sa rapidité, de sa sensibilité élevée et de son coût finalement assez réduit. Bien que très sensible et efficace pour la détection de virus dans le sperme la PCR peut parfois être limitée par la présence naturelle d'inhibiteurs dans le liquide séminal. Il semblerait que cet effet soit variable selon les espèces mais aussi selon les individus.

Au final, différentes techniques et stratégies ont été utilisées pour lutter contre cet effet inhibiteur du sperme sur la PCR, sans qu'un consensus ne soit véritablement établi. L'optimisation de l'extraction des acides nucléiques (avec notamment dilution, centrifugation et éventuellement chromatographie) semblent être un élément central dans l'élimination de ces inhibiteurs. L'importance réside dans la surveillance des faux-négatifs, que ce soit avec un contrôle interne ou une double vérification. Ainsi les techniques de PCR temps réel semblent bien adaptées à une recherche du virus CHV-1 dans le sperme de chiens.

## TROISIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

### OBJECTIFS

Cette partie a pour objectif d'étudier la relation entre le CHV-1 et le sperme afin de mieux caractériser le risque de transmission par le chien mâle lors de la reproduction.

**Les sous-objectifs dans ce travail sont les suivants :**

- 1) Identifier une interaction entre le sperme et le virus, notamment rechercher si le sperme canin possède une capacité virucide.
- 2) Etudier la capacité des spermatozoïdes à transmettre le virus en particulier après lavage(s).
- 3) Evaluer un possible effet inhibiteur du sperme sur la PCR.

### 3.1) MATERIEL ET METHODE

#### 3.1.1) *OBTENTION ET UTILISATION DU SPERME CANIN*

##### 3.1.1.1) Prélèvement de sperme frais

6 prélèvements de sperme ont été réalisés sur 4 chiens de race Beagles âgés de 4 ans.

Le prélèvement de sperme se déroule dans une pièce au calme en présence d'une femelle, en chaleur de préférence. Un vagin artificiel est utilisé. Il s'agit d'un cône en caoutchouc propre, chauffé à 37°C, température permettant de reconstituer en partie les caractéristiques du vagin d'une chienne et de préserver le sperme. Au bout du vagin artificiel sont placés successivement 3 tubes Falcon 13 ml stériles permettant de récupérer le sperme selon la phase d'éjaculation. Comme indiqué dans la partie bibliographique, paragraphe N° 2.1.2.3, la première phase est la phase urétrale, caractérisée par une couleur transparente. La seconde est la phase spermatique, caractérisée par un aspect blanchâtre et plus épais que la précédente. Enfin la dernière phase est la phase prostatique. Les tubes sont changés lorsque visuellement la phase suivante est reconnue.

Une fois le prélèvement effectué le chien est isolé le temps que les bulbes érectiles dégonflent et, si besoin, le pénis est replacé manuellement dans son fourreau après 10 minutes. Les prélèvements sont soit utilisés directement, soit congelés à -20°C pour être utilisés lors de manipulations ultérieures.

### **3.1.1.2) Préparation du liquide spermatique acellulaire (LSA) et des culots cellulaires de la phase spermatique**

Le terme « liquide spermatique acellulaire (LSA) » désigne la composante acellulaire de la deuxième phase du sperme, soit la phase spermatique. L'objectif est de pouvoir travailler avec le liquide accompagnant les spermatozoïdes lors de l'éjaculation, sans cellules qui pourraient interférer dans les manipulations en présence de virus. Cela permet de rechercher des virions libres dans ce milieu, par opposition à des virions qui pourraient être attachés aux spermatozoïdes, et donc de mieux identifier où peut se trouver le virus dans le sperme canin. Le LSA est obtenu après centrifugation de la phase spermatique à 4000 g, pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant acellulaire récupéré peut être utilisé directement ou être congelé à -20°C pour des utilisations ultérieures. Les culots cellulaires obtenus après cette centrifugation sont également conservés à -20°C.

### **3.1.2) CULTURES CELLULAIRES**

#### **3.1.2.1) Culture de la lignée cellulaire MDCK**

L'objectif de la culture cellulaire de cellules canines rénales MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) est d'avoir à disposition des cellules sensibles à l'infection par le CHV. La culture est réalisée selon le MO-6 (Annexe 1). Les cellules MDCK sont adhérentes au plastique des flacons de culture.

#### **Préparation du milieu de culture**

Le milieu de culture dit « DMEM complet » est composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) riche en glucose (4,5 g/l) avec de la glutamine stable et du sodium pyruvate (référence LM-D1111, biosera<sup>TM</sup>), du sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (référence CVFSVF00-01, eurobio scientific<sup>TM</sup>) à 10%, ainsi que de la pénicilline et de la streptomycine (référence CABPES01-0U, eurobio scientific<sup>TM</sup>) à 100 UI/ml. Le SVF est utilisé pour soutenir la croissance et la multiplication des cellules de mammifères en culture *in vitro*, tandis que la pénicilline et la streptomycine sont des antibiotiques utilisés pour limiter le risque de contamination bactérienne des cultures cellulaires.

## **Décongélation**

La lignée MDCK est congelée dans une solution contenant du DiMéthylSulfOxide (DMSO) (référence GAUDMS00-01, eurobio scientific™) et SVF, dans de l'azote liquide à -196°C. Une ampoule de cellules MDCK est décongelée au bain-marie à 37°C pendant 30 secondes. Sur le culot partiellement décongelé est ajouté du milieu DMEM complet, permettant d'inhiber l'effet cytotoxique du DMSO à température ambiante. Le contenu de l'ampoule est alors transféré après agitation et décongélation complète dans 8 ml de milieu complet. Le tube est ensuite centrifugé à 150 g, pendant 5 minutes à température ambiante.

## **Numération**

Une fois la décongélation effectuée, il est nécessaire de connaître le nombre de cellules viables pour ensemercer les flacons de culture. Le surnageant est donc éliminé et le culot repris dans un volume défini de milieu complet. Un aliquot des cellules est ensuite mélangé avec du bleu de Trypan. Ce dernier colore les cellules mortes en traversant les membranes plasmiques qui ne sont plus intègres et laisse les cellules vivantes incolores. La numération est réalisée à l'aide d'une cellule de Malassez.

## **Mise en culture**

Des flasques Falcon sont ensuiteensemencées selon le tableau du MO-6. La taille des flasquesensemencées est définie selon leur utilisation (voir paragraphes suivants). Elles sont ensuite placées à l'étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> pendant plusieurs jours au cours desquels les cellules vont se multiplier jusqu'à la confluence des tapis cellulaires. Dans certaines expériences (voir plus loin) les cellules MDCK sont temporairement cultivées à 34°C, ce qui n'affecte aucunement leur viabilité.

## **Passage**

A l'issue de cette étape de croissance un passage va être réalisé. Le passage consiste à réensemencer de nouvelles flasques à partir des cellules en culture. Ce passage est réalisé tous les 3 à 4 jours, au moment où le tapis cellulaire est entre 80 et 100% de confluence. Pour estimer la confluence, les tapis cellulaires sont observés au microscope optique. La confluence correspond à la surface de la flasque recouverte par les cellules (une confluence de 80 à 100% signifie que les cellules recouvrent entre 80 et 100% du fond de la flasque).

La première étape consiste en un lavage des tapis cellulaires à l'aide de Phosphate Buffer Saline (PBS) (référence CS1PBS01-01, eurobio scientific™). Ce tampon salin permet d'éliminer les cellules mortes ou décollées et les résidus de milieu du tapis cellulaire, tout en garantissant la viabilité des cellules sur de courtes durées grâce à ses caractéristiques isotoniques et non-toxiques.

La seconde étape permet de décoller les cellules du fond de la flasque pour pouvoir les récupérer. Pour cela de la trypsine est utilisée (référence P10-023100, PAN Biotech™). Il s'agit d'une enzyme protéolytique qui lyse les protéines membranaires d'adhésion, permettant ainsi de séparer les cellules de leur support. Une fois l'ensemble du tapis cellulaire décollé, du milieu est de nouveau ajouté afin de neutraliser l'action de la trypsine. Le contenu des flasques est ensuite récupéré, il peut alors être centrifugé et l'étape de numération réalisée. Enfin de nouvelles flasques seront ensemencées si besoin, ou bien la culture peut être arrêtée et les cellules être congelées. Le nombre de passage est systématiquement noté et les cellules ne sont pas utilisées au-delà de 30 passages, car on note une perte de viabilité et une moins bonne multiplication des cellules, ce qui risquerait d'altérer leurs propriétés en regard de l'infectiosité.

### **Congélation**

Cette dernière étape permet de conserver à long terme les cellules pour une utilisation ultérieure. Une fois l'étape de numération réalisée un nombre défini de cellules est prélevé et centrifugé. Le surnageant est éliminé. Le culot est repris dans 1 ml de mélange de SVF et de DMSO, puis l'ensemble est déposé dans une ampoule à congélation. Cette ampoule est progressivement refroidie : dans un premier temps elle est placée dans une boîte contenant de l'isopropanol à température ambiante. Dans un second temps cette boîte est placée à -80°C pendant 12h. Finalement, l'ampoule est placée dans un canister d'azote liquide à -196°C.

#### **3.1.2.2) Amplification de la souche virale DK13 sur cellules MDCK**

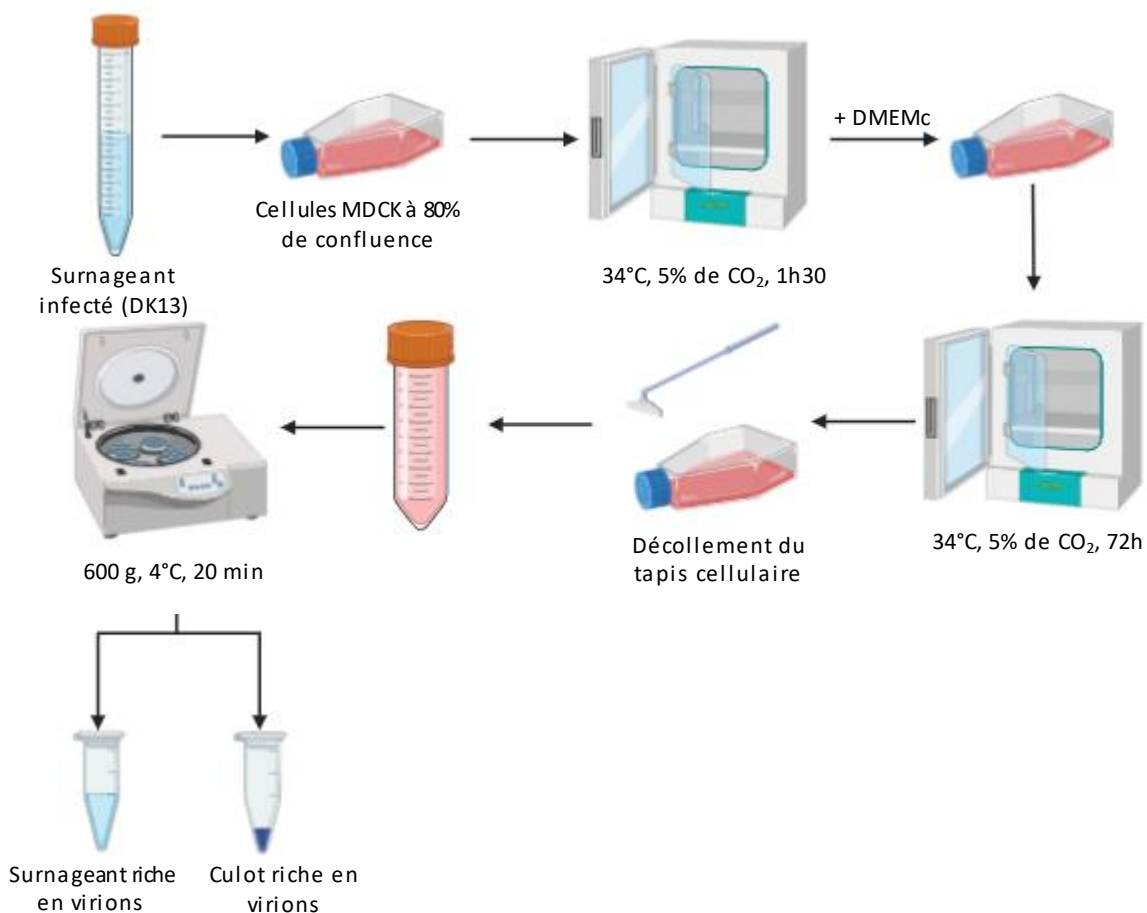
L'objectif de cette manipulation est d'utiliser un inoculum contenant du CHV afin de le multiplier sur des tapis cellulaires de cellules MDCK, pour pouvoir par la suite le quantifier et/ou l'utiliser dans des tests *in vitro*. Le CHV utilisé initialement est issu d'un prélèvement biologique et date de l'année 2009. La souche virale est la souche DK13 (Maurière, Bencharif, Meurens 2019). Les amplifications sont réalisées selon le MO-10 (voir annexe 2).

Des tapis cellulaire de cellules MDCK en flasque 75 cm<sup>3</sup> (F75) à 80% de confluence sont utilisés. Cela correspond en moyenne à 2 jours de culture après le passage des cellules. Le milieu de



culture des cellules est retiré et le tapis cellulaire est lavé 2 fois avec du PBS. L'inoculation est réalisée dans un volume de milieu restreint et la flasque est mise à l'étuve à 34°C, 5% de CO<sub>2</sub> pendant 1 h 30. Enfin du milieu DMEM complet est rajouté, sans lavage. La flasque est ensuite incubée pendant 72 h au contact de l'inoculum.

A la fin de la durée d'amplification le tapis cellulaire observé au microscope optique pour vérifier l'apparition de plage de lyse et comparer l'aspect du tapis cellulaire avec celui des témoins. Le tapis est ensuite décollé à l'aide d'un râteau stérile. Le contenu de la flasque est centrifugé 20 minutes à 600 g à 4°C. Le surnageant et le culot sont aliquotés séparément puis conservés à -80°C. Ces deux types d'échantillons sont riches en virus, permettant une titration de ce dernier, notamment sur le surnageant acellulaire, via notamment la détermination de la TCID<sub>50</sub> (Tissu Culture Infectious Dose 50), qui est une mesure utilisée en virologie pour évaluer la quantité de virus nécessaire pour infecter 50 % des cellules dans une culture tissulaire (non réalisée lors de ce travail).



***Figure 14 : Amplification du virus (souche DK13) sur cellules MDCK (réalisé avec Biorender.com)***

Le titre en virus augmente au fur et à mesure des amplifications virales, jusqu'à atteindre un plateau. Les surnageants utilisés lors des amplifications avaient toujours un TCID50 supérieur à  $3,0 \times 10^3$  TCID50/ml.

### **3.1.2.3) Culture des spermatozoïdes**

Des paillettes de sperme congelé sont décongelées en les plongeant brièvement au bain-marie à 37°C, puis les spermatozoïdes sont incubés dans du milieu de conservation CaniPlus Chill LT « Chill LT » (référence 13700/0045, minitube™) à 34°C, 5% de CO<sub>2</sub>, et un suivi de leur mobilité et du pourcentage de spermatozoïdes progressifs est réalisé sur 24h, à l'aide d'un analyseur de semence IVOS (système CASA).

Du sperme frais est également utilisé. La phase spermatique est ensuite mélangée avec du milieu de conservation « Chill LT », puis incubée à 34°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Un suivi de la mobilité et du pourcentage de spermatozoïdes progressifs est réalisé avec le même appareil.

Des résultats non communiqués ici, montrent une meilleure viabilité des spermatozoïdes provenant du sperme frais ainsi qu'une diminution rapide de la survie des spermatozoïdes au-delà de 24h d'incubation.

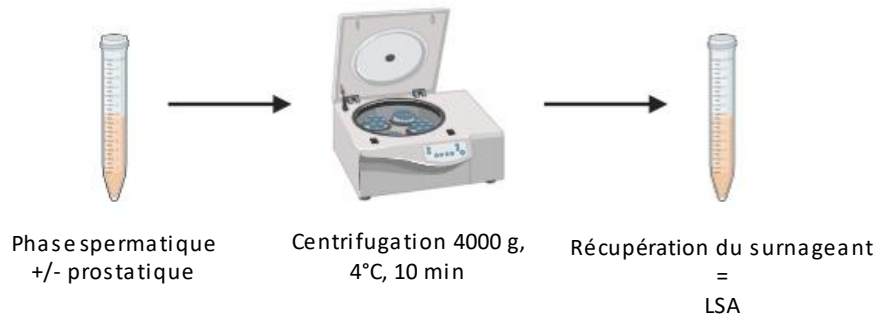
### **3.1.3) RECHERCHE D'UN POSSIBLE EFFET VIRUCIDE DU SPERME**

Comme vu dans le paragraphe 2.2.3 le sperme a un effet modulateur sur les infections virales, et notamment dans certaines situations, un effet inhibiteur de l'infection de certains virus, s'apparentant à un effet virucide. Cet effet virucide a été suspecté au cours de précédentes manipulations réalisées par notre équipe de recherche. Celles-ci consistaient à essayer d'isoler une souche de CHV-1 à partir de sperme positifs au CHV-1 en PCR (Charles et al. 2022) et analyses qui ont suivi lors de stage BTS2 (A Lazennec 2023). L'isolement n'a pas été possible et l'hypothèse d'un effet virucide a été émise (résultats non présentés).

L'objectif de cette expérience est de mettre en contact le virus avec du liquide spermatique acellulaire, d'ajouter cet *inoculum* au milieu de culture des cellules MDCK, et d'évaluer s'il y a une baisse d'efficacité de l'infection des cellules ou même une absence d'infection, évaluée par l'analyse relative des Cq en PCR en temps réel de séquences du CHV-1 (voir ci-dessous). Cette inhibition, si elle a lieu, pourrait être le témoin d'une action virucide du LSA, confirmant notre hypothèse. Les étapes suivantes sont réalisées selon le MO-15 (voir annexe 3 et annexe 4) :

## Préparation du liquide spermatique acellulaire

Comme expliqué précédemment la phase spermatique d'un sperme prélevé puis congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  est décongelée puis centrifugée afin de récupérer le surnageant. Pour compléter le volume de LSA qui était parfois insuffisant, le surnageant de la phase prostatique du même chien a été rajoutée, afin d'obtenir 2 ml de LSA. Deux LSA ont été testés.

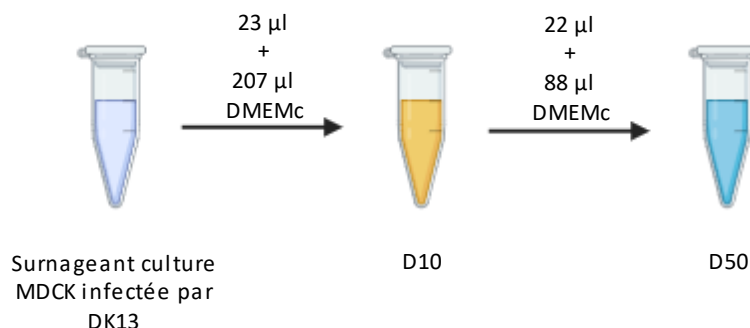


*Figure 15 : Préparation du liquide spermatique acellulaire (réalisé sur Biorender.com)*

## Préparation des dilutions virales

Deux dilutions dans du DMEM complet (DMEMc) ont été réalisées à partir du surnageant d'une amplification virale d'un TCID<sub>50</sub> de  $4,22 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml préparée antérieurement à ce travail : une dilution au  $1/10^{\text{ème}}$  (nommée D10) et une dilution au  $1/50^{\text{ème}}$  (nommée D50).

Dans l'éventualité où le sperme possède une capacité virucide il nous a ainsi semblé intéressant de l'évaluer face à deux concentrations virales. Cela permet d'évaluer non seulement l'existence d'un éventuel effet virucide, mais aussi si cet effet peut être surpassé lorsque la charge virale est trop élevée.



*Figure 16 : Préparation des dilutions virales (réalisé sur Biorender.com)*

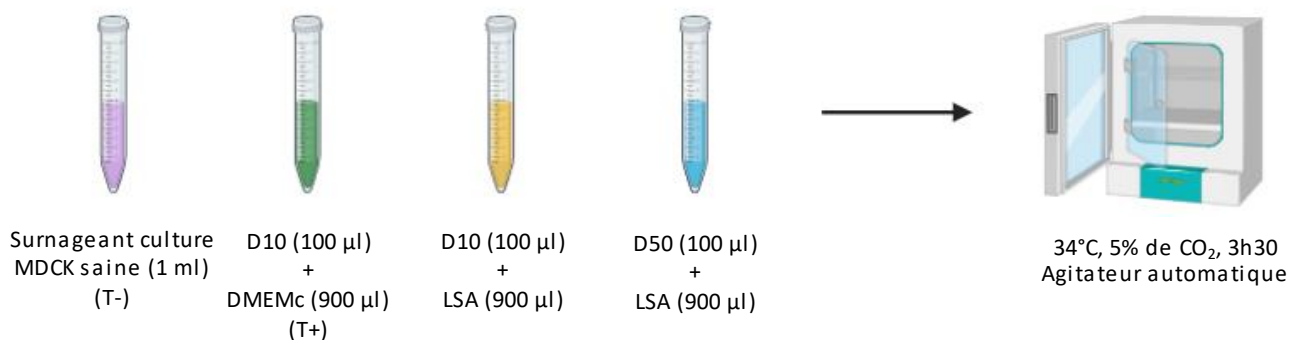
## Préparation des solutions d'incubations

Ces solutions dites d'incubation sont les mélanges réalisés entre virus et LSA avant leur passage sur cultures cellulaires MDCK. Ce temps de contact doit permettre d'établir un possible effet virucide.

4 solutions sont préparées :

- Une solution témoin négatif, constituée d'un surnageant d'une précédente culture cellulaire de cellules MDCK saines, c'est-à-dire sans aucun contact avec le virus.
- Une solution témoin positif, constituée de la dilution virale D10 diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans du DMEMc, connue pour infecter un tapis de MDCK
- Deux solutions tests, constituées respectivement des dilutions virales D10 ou D50, diluées au 1/10<sup>ème</sup> dans le LSA (ce dernier est donc largement majoritaire à 90%, voir Figure 17)

Ces 4 solutions sont placées à l'étuve à 34°C, 5% de CO<sub>2</sub> sur un agitateur automatique pendant 3h30. L'objectif est de permettre le contact entre le LSA et le virus pendant la durée d'incubation.

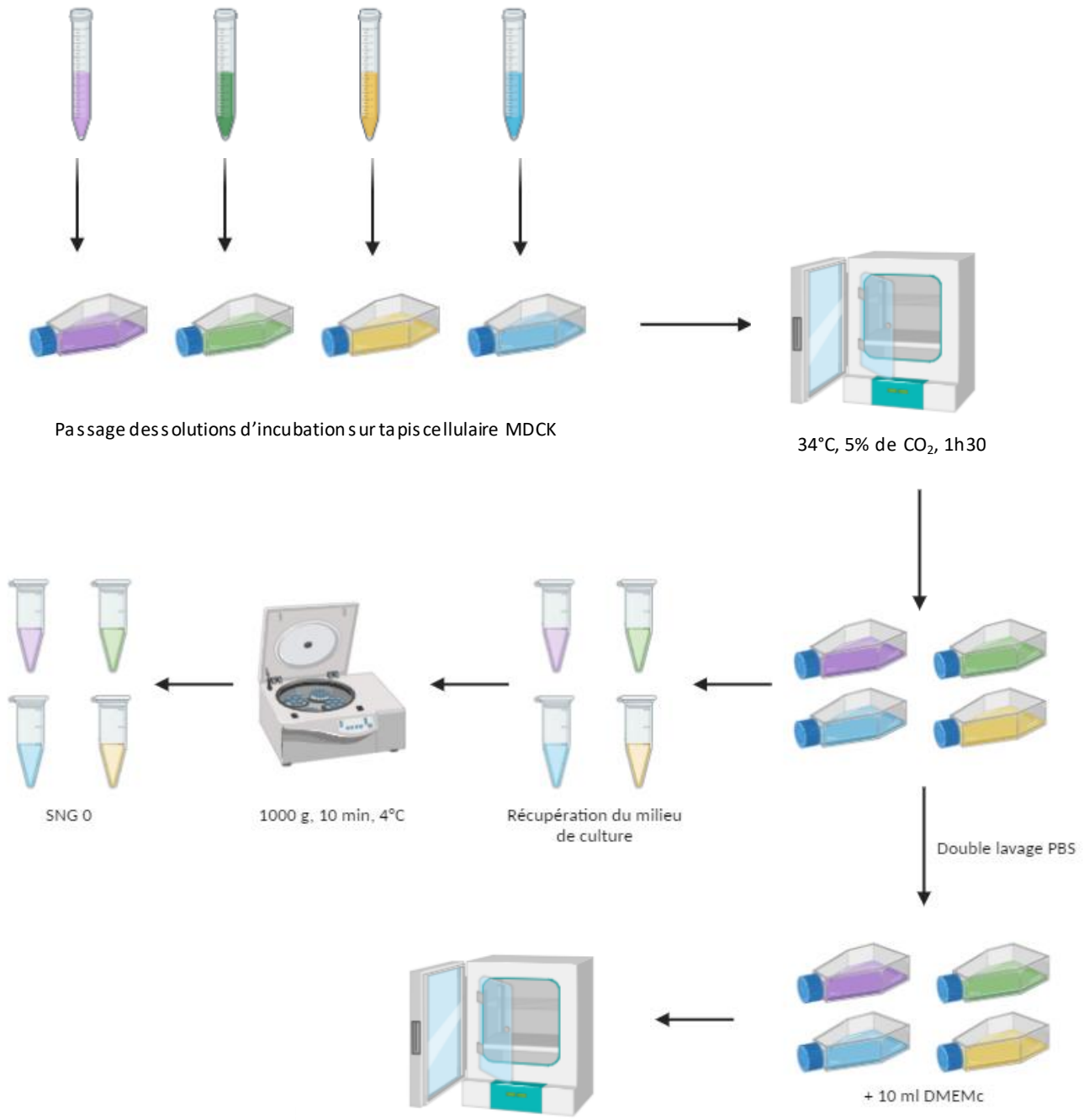


*Figure 17 : Préparation des solutions d'incubations (réalisé sur Briorender.com)*

## Incubation sur les tapis cellulaires MDCK

Les 4 solutions sont ajoutées au milieu de culture de 4 flasques 25 cm<sup>3</sup> (F25) déjà ensemencées avec des cellules MDCK à sub-confluence. Les flasques sont ensuite placées en incubation à 34°C, 5% de CO<sub>2</sub> pendant 1h30. Le surnageant est ensuite récupéré et congelé à -80°C, et les tapis cellulaires sont lavés à l'aide de PBS. Du milieu DMEM complet est remis sur les tapis cellulaires et les flasques sont placées de nouveau à l'étuve. L'objectif étant de permettre au virus s'il était présent (T+) ou encore intègres (solutions 3 et 4) d'infecter les cellules MDCK avant

le retrait du milieu de culture. Une fois cette étape réalisée, on attend que le virus puisse éventuellement être amplifié (au moins pour le témoin positif) sur les tapis cellulaires.



*Figure 18 : Incubation sur les tapis cellulaires MDCK (réalisé sur Biorender.com)*

### **Surveillance et arrêt de l'incubation**

Les tapis cellulaires sont contrôlés au microscope optique deux fois par jour. L'incubation est arrêtée une fois le tapis cellulaire du témoin négatif à 100% de confluence ou lorsqu'au moins une des flasques contenant du virus présente des signes francs d'infection (notamment le témoin positif).

Le surnageant est alors retiré, centrifugé et congelé à -80°C. Le tapis cellulaire est à nouveau lavé, puis récupéré, soit par grattage (voir annexe 3) soit par trypsination des cellules (voir annexe 4). Le surnageant du dernier lavage au PBS est récupéré et congelé à -80°C, pour vérifier à priori l'absence de virus par PCR en temps réel. Les culots sont également congelés à -80°C après centrifugation et asséchement. Les échantillons sont conservés en attente d'analyse par PCR en temps réel EvaGreen® pour la détection d'ADN du virus DK13.

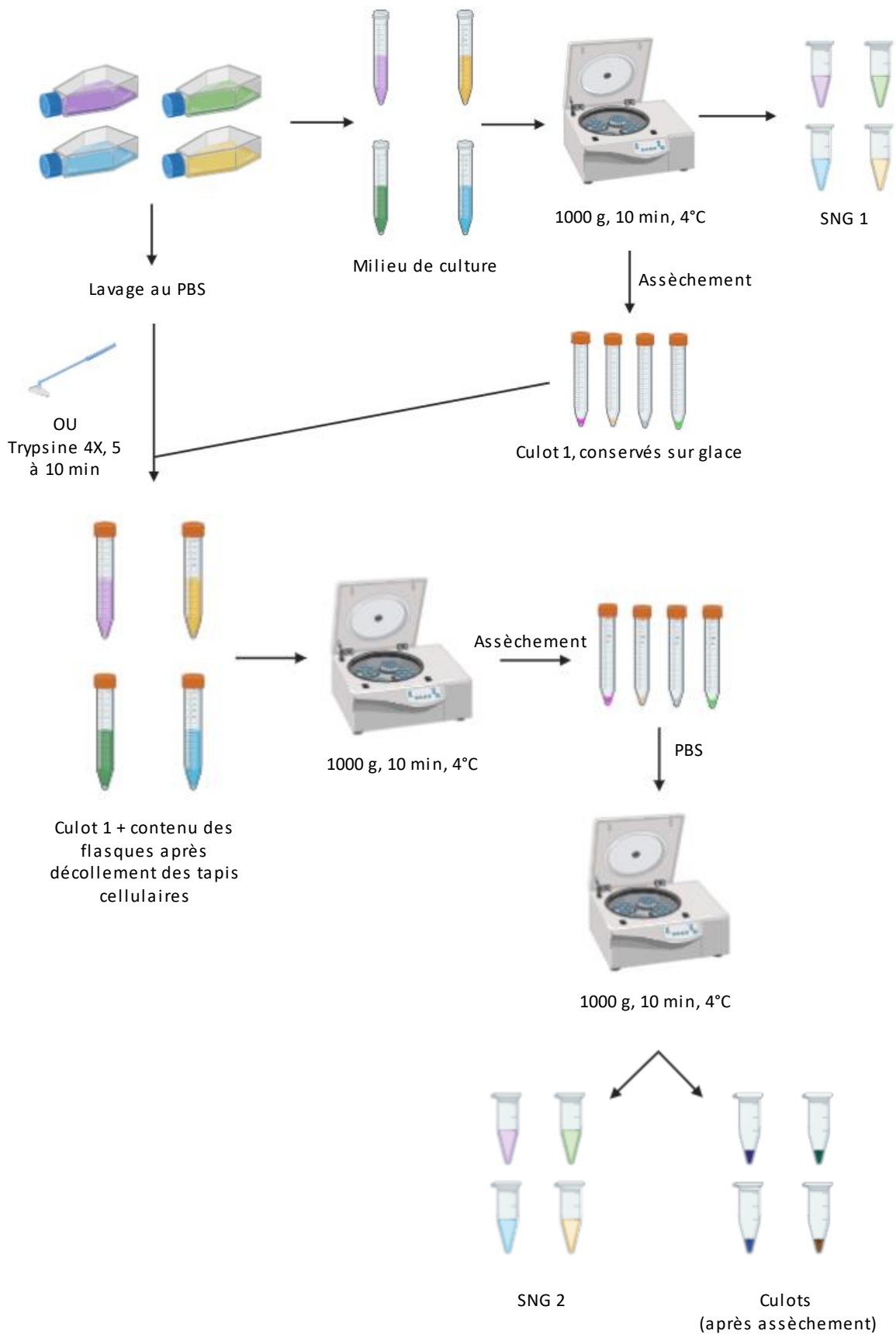


Figure 19 : Surveillance et arrêt de l'incubation (réalisé sur Biorender.com)

### **3.1.4) ETUDE DE LA CAPACITE DES SPERMATOZOÏDES A TRANSMETTRE LE VIRUS APRES LAVAGES**

L'objectif de cette manipulation est de mettre artificiellement en contact le virus CHV-1 et des spermatozoïdes pour tester l'hypothèse d'une possibilité d'infection du spermatozoïde ou de la fixation du virus à sa surface. Dans les deux cas cela pourrait indiquer une possible transmission du virus à la femelle lors de la reproduction. Les spermatozoïdes seront ensuite lavés avant d'être placés sur des nacelles au-dessus de tapis cellulaires de MDCK. Ces nacelles possèdent un filtre de 0,4 µm laissant passer les molécules, les virus et le milieu mais qui ne permet pas le passage des spermatozoïdes. De ce fait, il n'y a pas de contact direct entre les spermatozoïdes et les cellules MDCK. Ainsi, s'il y a infection du tapis cellulaire cela implique soit :

- une infection préalable des spermatozoïdes (virions en positions intracellulaire) qui seraient alors en capacité de transmettre le CHV-1 aux cellules MDCK de notre modèle d'étude.
- la capacité du virus à s'attacher de façon réversible aux spermatozoïdes, qui seraient là encore en capacité de transmettre le CHV-1 aux MDCK, malgré les lavages.

En cas d'absence d'infection des cellules MDCK cela signifierait que le virus ne peut pas pénétrer au sein des spermatozoïdes et qu'il serait possible de l'éliminer par lavages de spermatozoïdes.

Les étapes suivantes sont réalisées selon le MO-16 (voir Annexe 5) :

#### **Infection des spermatozoïdes**

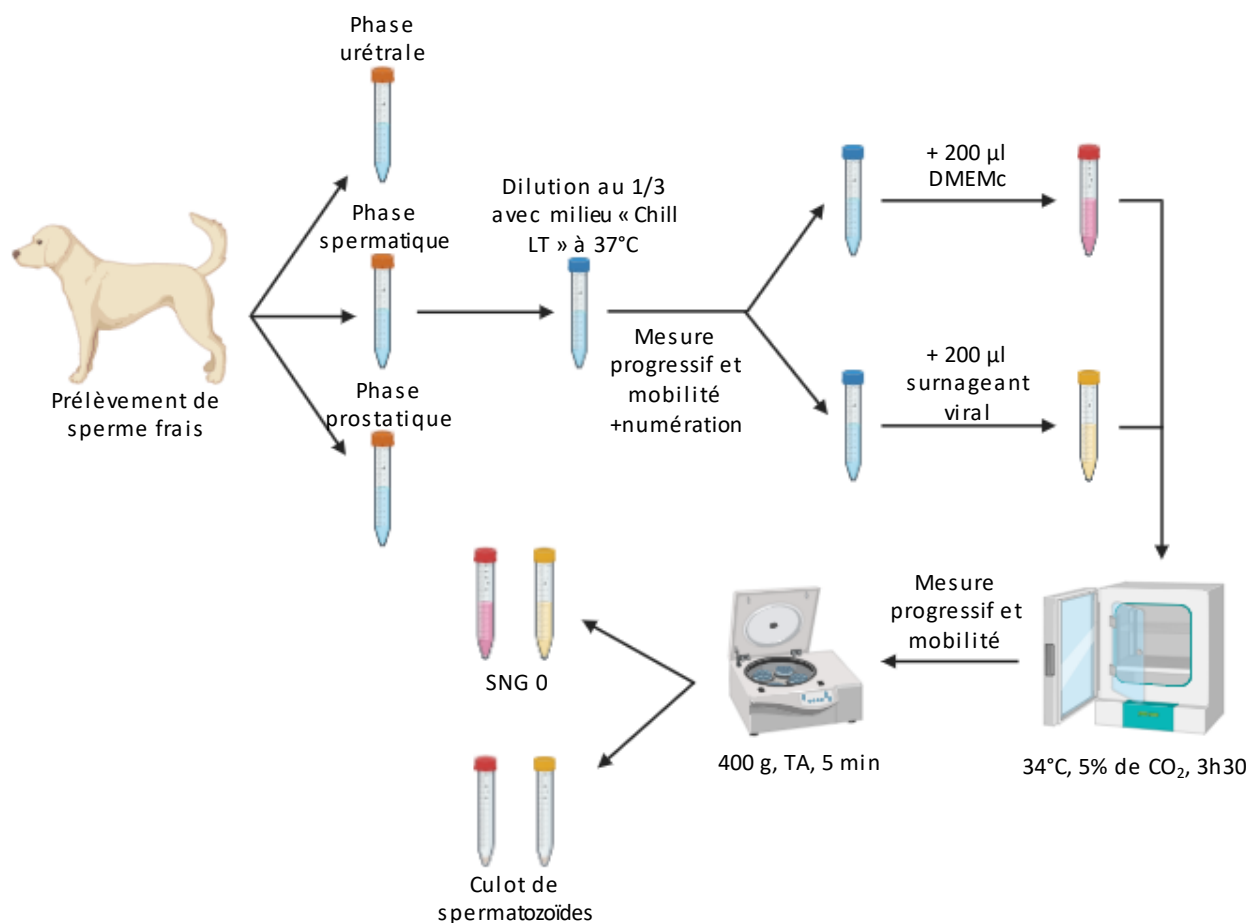
Deux phases spermatiques de deux chiens donneurs de spermes différents (n=2) sont diluées au 1/3 dans le milieu de conservation « Chill LT ». Une mesure de la mobilité des spermatozoïdes et du pourcentage de spermatozoïdes progressifs est réalisée, de même qu'une numération de ceux-ci, à l'aide d'un analyseur de semence IVOS (système CASA). La mobilité des spermatozoïdes indique leur capacité à se déplacer, et les spermatozoïdes progressifs correspondent aux spermatozoïdes se déplaçant de manière linéaire parmi les spermatozoïdes mobiles.

Les mélanges sont séparés en deux tubes de même volume. Pour chaque sperme, 200 µl d'un surnageant viral est ajouté dans l'un des tubes, tandis que le second reçoit 200 µl de DMEM complet (constituant le témoin négatif). Ces solutions sont incubées pendant 3 h 30 à l'étuve à 34°C, 5% de CO<sub>2</sub>. La durée d'exposition du sperme au CHV-1 a été augmentée ici (par rapport au



test « virucide » précédent pour augmenter la probabilité d'une infection des spermatozoïdes si elle est possible). Cette étape a pour but de permettre un contact entre le virus et les spermatozoïdes et éventuellement la pénétration du virus au sein des spermatozoïdes.

Une seconde mesure de la mobilité des spermatozoïdes et du pourcentage de progressif est ensuite réalisée. Les tubes sont alors centrifugés, le surnageant est récupéré et stocké à -20°C en vue d'une extraction d'ADN et d'une analyse PCR en temps réel de l'ADN viral (attendue positive pour les deux échantillons ayant reçu du surnageant viral).

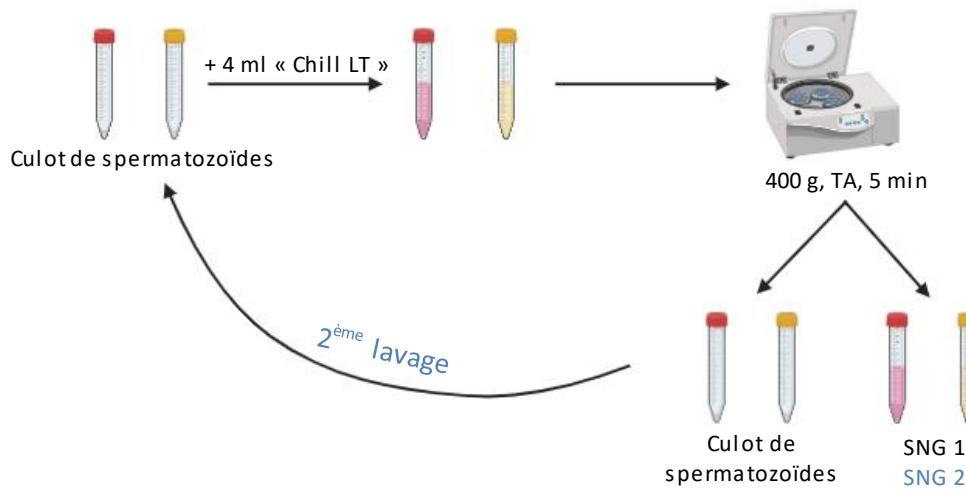


*Figure 20 : Infection des spermatozoïdes (réalisé sur Biorender.com)*

### Lavage des culots

Les culots de cellules (essentiellement composé de spermatozoïdes), exposés et non exposés au virus CHV-1, sont lavés à l'aide du milieu de conservation « Chill LT » puis centrifugés à 400 g pendant 5 minutes à température ambiante. Les surnageants sont récupérés et stockés à -20°C en vue d'une extraction d'ADN et d'une analyse PCR. Le nombre de lavage est arbitrairement fixé à 2. L'objectif de cette étape est de réduire ou d'éliminer le virus qui pourrait être présent à

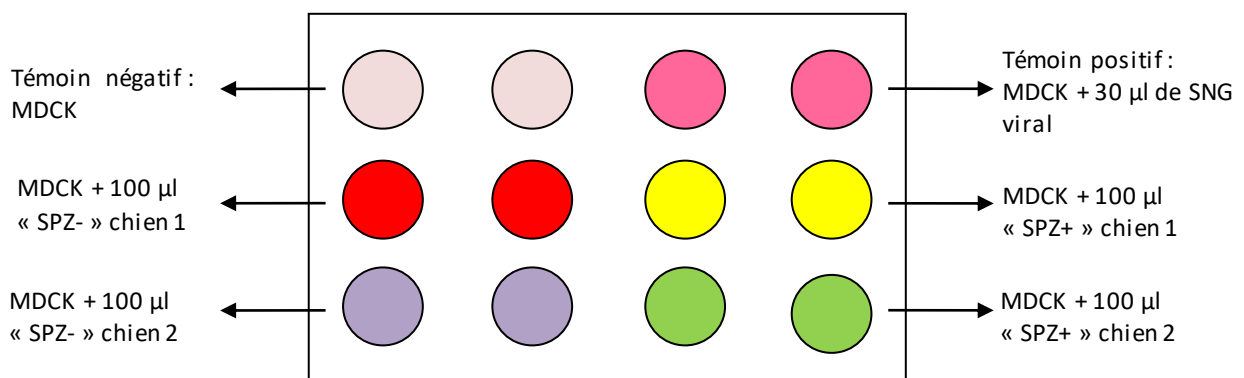
l'extérieur du spermatozoïde dans le liquide spermatique, ou bien le virus potentiellement attaché à la surface de ce dernier.



*Figure 21 : Lavage des culots (réalisé avec Biorender.com)*

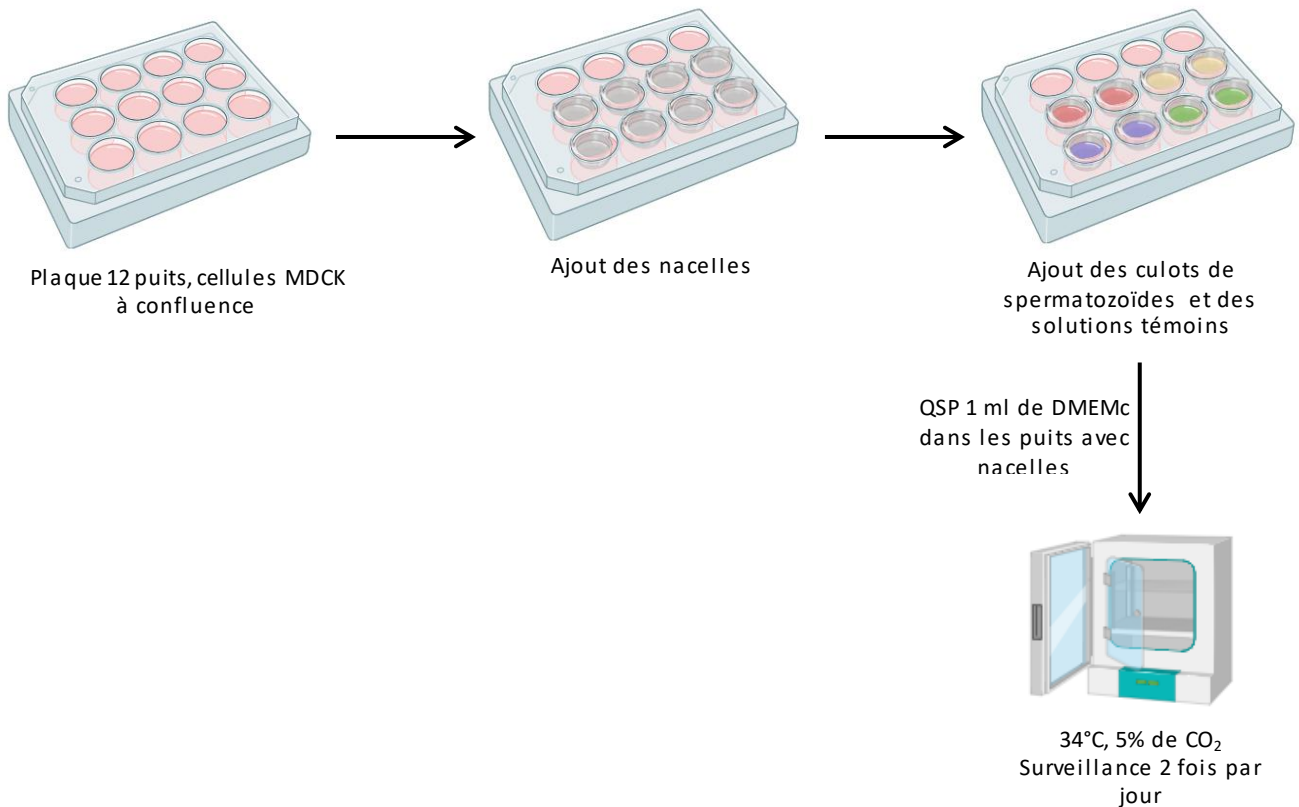
### Passage des spermatozoïdes sur tapis cellulaire MDCK

Une plaque 12 puits préalablement ensemencée avec des cellules MDCK à 0,4 millions de cellules par puits est utilisée. Après un changement du milieu de culture, des nacelles sont positionnées sur les puits recevant les spermatozoïdes exposés et non exposés au CHV-1. La plaque est divisée de la façon suivante:



*Figure 22 : Schéma de la plaque 12 puits avec nacelles*

La plaque avec nacelles est ensuite incubée pendant 24 h à 34°C, 5% de CO<sub>2</sub>. L'objectif de cette étape est de permettre une possible infection des cellules MDCK et donc une amplification virale, à partir des spermatozoïdes s'ils sont infectés ou porteurs de virus non éliminés par les 2 lavages.



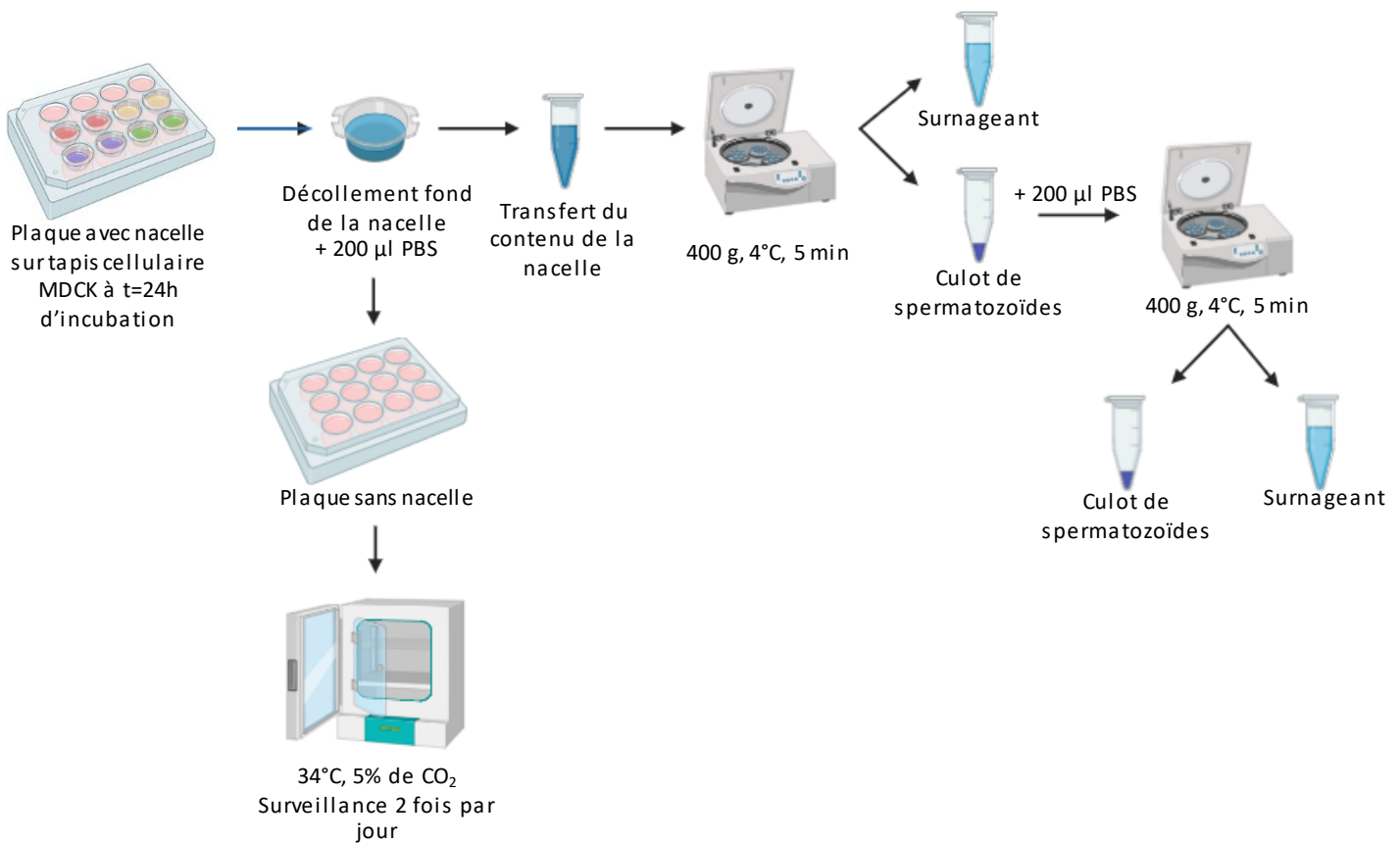
*Figure 23 : Passage des spermatozoïdes sur tapis cellulaire MDCK (réalisé sur Biorender.com)*

### Retrait des nacelles

Les nacelles (contenant les spermatozoïdes, éventuellement du virus et du milieu) sont retirées au bout de 24h d'incubation, ce qui correspond à la durée moyenne de survie des spermatozoïdes dans nos conditions expérimentales (voir paragraphe 3.1.2.3). C'est lors de ces 24h que le virus peut se répliquer dans les spermatozoïdes, s'il a pu y pénétrer, ou s'en détacher s'il y est attaché et être transmis aux cellules MDCK.

Les nacelles sont ensuite grattées et rincées à l'aide de PBS. Leur contenu est récupéré et centrifugé à 400 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et congelé. Un lavage des culots de spermatozoïdes est réalisé, le surnageant est de nouveau récupéré et congelé, de même

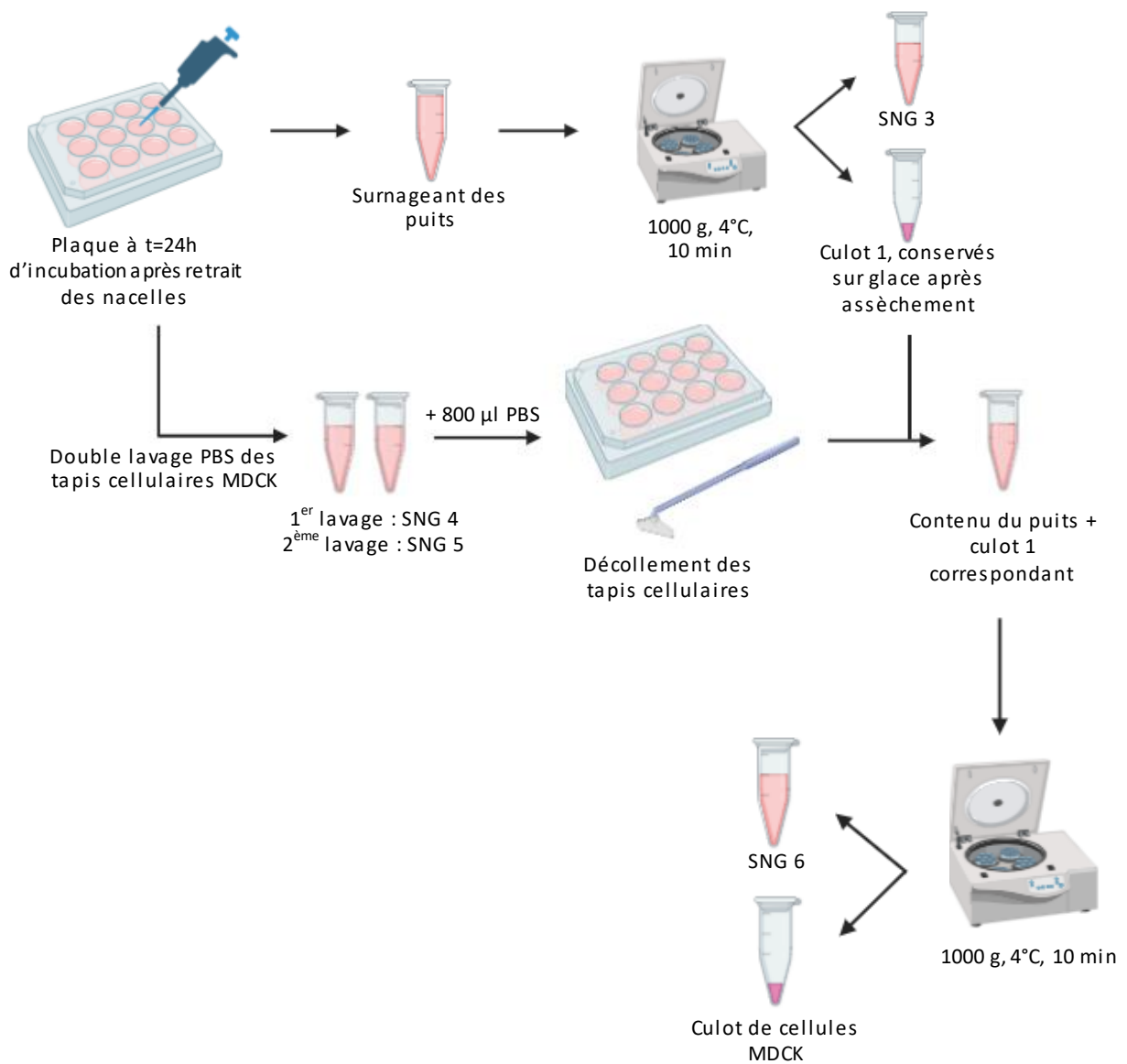
que les culots de spermatozoïdes après assèchement. La plaque 12 puits est remise en incubation à 34°C, 5% de CO<sub>2</sub> pour favoriser l'éventuelle amplification de l'infection des cellules MDCK.



*Figure 24 : Retrait des nacelles (réalisé avec Biorender.com)*

### Arrêt de la possible amplification viral

Au bout de 40 heures d'incubation sans nacelle, les tapis de cellules MDCK sont de nouveau observés au microscope optique pour rechercher un effet cytopathique (plages de lyses). Ensuite, le surnageant est récupéré et congelé. Les tapis cellulaires sont lavés 2 fois au PBS pour retirer les débris cellulaires et les virus qui pourraient encore se trouver à la surface des tapis, avant d'être grattés. Le contenu de chaque puits est ensuite centrifugé, le surnageant récupéré et congelé, de même que les culots après transfert en Eppendorf 1,5 ml, centrifugation et assèchement. L'ADN total de ces prélèvements est ultérieurement extrait en vue d'une recherche par PCR en temps réel d'ADN viral.



*Figure 25 : Arrêt de la possible amplification virale (réalisé sur Biorender.com)*

### **3.1.5) EVALUATION D'UN POSSIBLE RISQUE D'INHIBITION DE LA PCR PAR LE LIQUIDE SPERMATIQUE ACELLULAIRE (LSA)**

Lors de cette manipulation une gamme de dilution d'ADN de cellules MDCK infectées par le virus CHV-1 souche DK13 va être réalisée. Cette gamme sera ensuite diluée dans de l'eau ou dans du liquide spermatique acellulaire. Les différents échantillons de ces gammes seront ensuite analysés en PCR en temps réel. L'analyse des Cq permettant une quantification relative du CHV-1 en fonction des dilutions d'ADN de MDCK infectées et de la présence ou de l'absence de LSA.

Les objectifs de cette manipulation sont multiples :

- Déterminer la limite de détection de la PCR EvaGreen® en eau afin de caractériser sa sensibilité
- Mettre en évidence une diminution de la sensibilité de la PCR en présence de liquide spermatique, et donc un effet inhibiteur de celui-ci sur la PCR.
- Déterminer une dilution de liquide spermatique permettant une réapparition systématique du signal PCR.
- Explorer une éventuelle variabilité interindividuelle de l'inhibition de la PCR par le liquide spermatique.

#### **3.1.5.1) Réalisation d'une gamme de dilutions d'ADN de cellules MDCK infectées par DK13**

La gamme de dilution en eau d'ADN extrait de cellules MDCK infectées est réalisée à partir d'un échantillon d'ADN positif au virus et dont la concentration en acide nucléique est connue (l'échantillon a déjà été analysé en PCR et avec le NanoDrop, voir paragraphe 3.1.6.3 et 3.1.7). La gamme contient des dilutions sériées de 10 en 10, allant de 200 ng/μl à 2,0x10<sup>-4</sup> ng/μl. Elle est donc composée de 7 échantillons nommés D<sub>0</sub> à D<sub>6</sub> (D<sub>0</sub> correspond à l'échantillon le plus concentré et D<sub>6</sub> à l'échantillon le moins concentré, voir Tableau 4). Par la suite cette gamme est désignée par le nom de « gamme mère ».

Tableau 4 : Concentration des échantillons de la gamme « mère » de dilutions d'ADN de cellules MDCK infectées par DK13

Echantillon	D <sub>0</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>
[ADN] (ng/μl)	200	20	2,0	2,0x10 <sup>-1</sup>	2,0x10 <sup>-2</sup>	2,0x10 <sup>-3</sup>	2,0x10 <sup>-4</sup>

### 3.1.5.2) Evaluation de la sensibilité de la PCR en eau

La gamme mère précédemment décrite est diluée au ½ dans de l'eau pure, il s'agit de la « gamme fille eau ». Les différents échantillons de cette gamme sont nommés D<sub>x</sub> eau, avec x allant de 0 à 6 (voir Tableau 5). 5 µl de chaque échantillon sont déposés dans les puits lors de la PCR en temps réel EvaGreen® recherchant l'ADN du CHV-1.

*Tableau 5 : Concentration des échantillons de la gamme fille en eau*

Echantillon	D <sub>0</sub> eau	D <sub>1</sub> eau	D <sub>2</sub> eau	D <sub>3</sub> eau	D <sub>4</sub> eau	D <sub>5</sub> eau	D <sub>6</sub> eau
[ADN] (ng/µl)	100	10	1,0	1,0x10 <sup>-1</sup>	1,0x10 <sup>-2</sup>	1,0x10 <sup>-3</sup>	1,0x10 <sup>-4</sup>

### 3.1.5.3) Analyses préliminaires d'une possible inhibition de la PCR par le LSA

Dans des explorations préliminaires, deux liquides spermatiques acellulaires (n=2, LSA<sub>1</sub> et LSA<sub>2</sub>) sont dilués au 1/5<sup>ème</sup>, 1/20<sup>ème</sup>, 1/40<sup>ème</sup> et au 1/100<sup>ème</sup> avec de l'eau pure. Ces quatre dilutions de LSA sont à nouveau diluées au ½ avec certains échantillons de la gamme mère (voir Tableau 6). 5 µl de ces préparations sont ensuite déposées dans les puits lors de la PCR en temps réel EvaGreen®. Les échantillons de la gamme fille eau sont utilisés comme témoins positifs (conditions similaires sans LSA). Toutes les combinaisons entre les solutions de la gamme mère et les LSA dilués n'ont pas été testées afin de limiter le nombre d'analyse. Les combinaisons non analysées pourront toujours l'être dans un second temps au besoin.

*Tableau 6 : Dilutions des liquides spermatiques acellulaires et leur mélange avec les échantillons de la gamme mère.*

	D <sub>0</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
LSA <sub>1</sub> 1/5					
LSA <sub>2</sub> 1/5					
LSA <sub>1</sub> 1/20					
LSA <sub>2</sub> 1/20					
LSA <sub>1</sub> 1/40					
LSA <sub>2</sub> 1/40					
LSA <sub>1</sub> 1/100					

*En vert : les préparations ont été testées*

*En blanc : les préparations n'ont pas été testées*

#### **3.1.5.4) Analyse d'une possible inhibition de la PCR par le LSA et variabilité interindividuelle**

Dans de nouvelles analyses optimisées en fonction des expériences préliminaires précédentes, de nouveaux liquides spermatiques acellulaires (n=6) sont dilués au 1/50<sup>ème</sup>, 1/200<sup>ème</sup> et 1/500<sup>ème</sup> et sont associés à trois des dilutions virales (D0, D2, D4) afin d'observer à partir de quelle dilution le signal est retrouvé et est identique à la gamme diluée en eau. Ces 6 LSA vont permettre également de comparer une éventuelle variation du signal selon le chien fournissant le prélèvement.

### **3.1.6) EXTRACTIONS D'ADN DES ECHANTILLONS**

#### **3.1.6.1) Principe général**

L'objectif de cette manipulation est d'extraire et de purifier l'ADN total (canin et éventuellement viral) de différents échantillons : culots cellulaires de MDCK ou de spermatozoïdes potentiellement infectés par le CHV ou encore surnageants de cultures cellulaires. Une fois l'ADN génomique canin et potentiellement viral extraits une analyse PCR sera réalisée.

L'extraction d'ADN est composée de plusieurs étapes successives : lyse cellulaire, précipitation, lavage et élution. Elle est basée sur la chromatographie d'affinité entre une colonne de silice et les acides nucléiques.

#### **3.1.6.2) Protocoles différents utilisés selon le type de prélèvement**

##### *3.1.6.2.1) Extraction à partir de culots cellulaires*

L'objectif est d'extraire des culots de cellules MDCK ou des culots de spermatozoïdes l'ADN génomique ainsi que, s'il y est présent, l'ADN viral du CHV-1.

La manipulation est effectuée selon le MO-2 (Annexe 6) à l'aide du kit « Genomic DNA NucleoSpin® Tissue » (Référence 740952, Macherey-Nagel™). La première étape est la lyse cellulaire. Elle est réalisée à l'aide de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), de protéinase K et de chlorure de guanidinium. Il s'agit respectivement d'un détergent ionique, d'une enzyme et de sels chaotropiques. Leurs activités combinées permettent de désorganiser les membranes cellulaires et de détruire les protéines.



Avant transfert en colonne de silice, de l'éthanol absolu est ajouté pour précipiter l'ADN et favoriser son adhésion à la membrane de silice. L'ADN, chargé négativement, se fixe par affinité à cette membrane, chargée positivement. Plusieurs lavages sont alors réalisés, permettant d'éliminer les éléments non liés à la colonne (débris cellulaires, protéines) et de ne conserver que l'ADN. Une fois cette étape de purification de l'ADN terminée, un tampon d'éluion alcalin est déposé. Celui-ci vient se lier avec l'ADN avec une affinité plus forte que la colonne, permettant à l'ADN de traverser celle-ci et d'être récupéré pour dosage et analyse PCR.

#### *3.1.6.2) Extraction à partir de surnageants acellulaires*

L'objectif est d'extraire des surnageants acellulaire (par exemple de culture MDCK, mais aussi de phase spermatique ou de lavages...), ne contenant pas ou très peu de cellules, mais potentiellement de l'ADN du CHV-1. Cet ADN extrait sera ensuite analysé en PCR pour la présence de séquences virales. La manipulation est réalisée selon le MO- 5 (Annexe 7) à l'aide du kit « NucleoSpin Virus, Mini kit for viral RNA/DNA purification » (Référence 740983, Macherey-Nagel™). Le principe de l'extraction est globalement similaire à celui précédemment décrit concernant les culots cellulaires. Cette extraction comprend une étape supplémentaire entre la lyse cellulaire et la précipitation. Celle-ci consiste à ajouter de l'« ARN carrier ». Il permet d'augmenter artificiellement la concentration en acide nucléique présente dans le lysat avant passage sur la colonne. Ainsi, la précipitation est optimale et il est possible d'extraire l'ADN viral présent en faibles quantités dans les surnageants.

#### **3.1.6.3) Mesure de la concentration en ADN des échantillons et de leur qualité**

Une fois l'ADN extrait, quelques microlitres de chaque échantillon sont sacrifiés pour déterminer la pureté et la concentration en acides nucléiques. Cette analyse est effectuée avec le Spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 / 2000c (référence ND2000LAPTOP, Thermo Scientific™). Deux microlitres de l'échantillon sont déposés puis analysés par l'appareil par spectrophotométrie Ultra-Violet (U.V.). Les absorbances 260 nm (A260) et 280 nm (A280) sont mesurées. Elles permettent de calculer le rapport A260 nm/A280 nm qui renseigne sur la qualité de l'extraction. Ce rapport doit en effet être idéalement compris entre 1,8 et 2,0. L'absorbance à 260 nm correspond à l'absorbance des bases azotées de l'ADN ou de l'ARN et l'absorbance à 280 nm correspond à celles d'acides aminés aromatiques. En cas de contamination par des résidus protéiques, ce rapport tendra à être diminué.

L'absorbance à 260 nm quant à elle permet (lorsque la qualité a été validée) de déterminer la concentration d'ADN ou d'ARN en ng.µL-1 grâce à la loi de Beer-Lambert ( $A = \epsilon \times l \times c$  ; avec  $\epsilon$ , le coefficient d'extinction molaire (mol.L-1.cm-1) variable selon la nature des acides nucléiques ; l, la longueur du trajet optique (cm) ; et c, la concentration molaire de l'échantillon (mol.L-1)).

La détermination de la concentration en ADN n'est possible que pour l'ADN extrait à partir de culot cellulaire. En effet la présence de l'ARN carrier, dans le cas d'extraction à partir de surnageant ou liquides acellulaires, vient fausser cette mesure.

### **3.1.7) RECHERCHE D'ADN VIRAL PAR PCR EN TEMPS REEL EVAGREEN®**

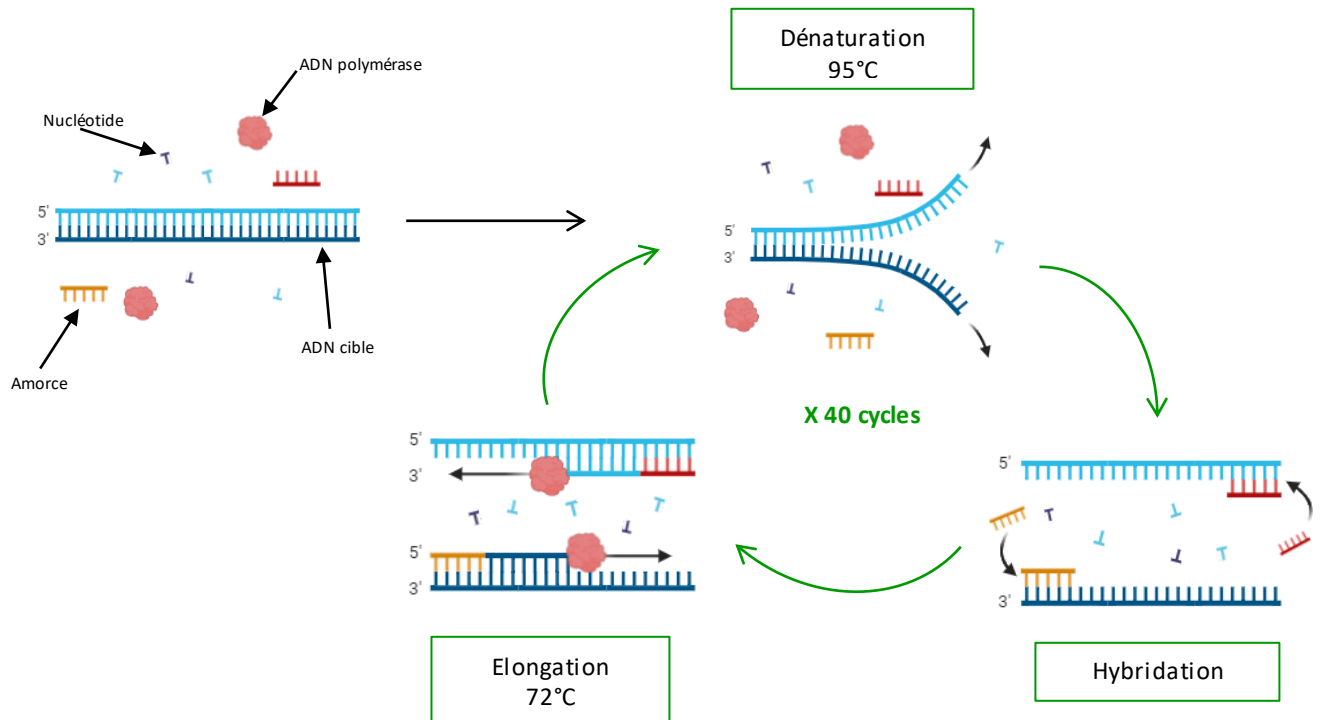
La PCR classique est une méthode courante d'amplification de l'ADN génomique qui permet d'obtenir de grandes quantités d'ADN cible, encadré par deux amorces nucléotidiques, facilement détectables sur gel d'électrophorèse, à partir d'échantillons faiblement concentrés. Ce processus commence par une phase de dénaturation initiale à 95°C, où l'ADN bicaténaire est séparé en brins d'ADN monocaténaires. Ensuite, un cycle de trois étapes est répété plusieurs fois. Ces étapes incluent :

**Dénaturation** à 95°C : séparation de l'ADN double brin.

**Hybridation** des amorces sur l'ADN simple brin à une température légèrement inférieure à la température de fusion ( $T_m$ ) du couple d'amorces choisi.

**Élongation** à 72°C, où l'ADN polymérase reconstitue le brin complémentaire à partir des amorces.

Ces cycles sont répétés environ 40 fois, avec une étape finale d'élongation pour compléter si besoin les derniers brins d'ADN néoformés.



*Figure 26 : Principe de la PCR classique (réalisé sur Biorender.com)*

La PCR en temps réel utilise le même principe de base que la PCR classique, mais y ajoute un système de détection du produit d'amplification par fluorescence. Cette méthode permet de suivre l'amplification de l'ADN en temps réel, cycle par cycle, offrant ainsi une observation directe et rapide des résultats avec une plus grande efficacité et automatisation. En outre, la PCR en temps réel peut fournir une analyse semi-quantitative ou quantitative du nombre de cibles présentes dans l'échantillon initial (on parlera alors de PCR quantitative ou qPCR).

Le colorant fluorescent EvaGreen® a été utilisé lors de nos différentes analyses PCR en temps réel comme marqueur. Ce colorant EvaGreen® est un intercalant de l'ADN : en solution, il n'émet que très peu de fluorescence. Cependant, lors de l'élongation par l'ADN polymérase, ce colorant se fixe à l'ADN amplifié, entraînant l'émission d'une fluorescence verte. Le colorant EvaGreen® se lie donc à chaque nouveau brin d'ADN formé, ce qui signifie que plus le nombre d'amplicons (produits d'amplification de la cible, limité par les amorces spécifiques) est important, plus la fluorescence cumulée mesurée au sein de l'échantillon en cours d'analyse va augmenter.

La réalisation d'analyses PCR pour rechercher l'ADN du CHV-1 nécessite l'utilisation d'amorces spécifiques du virus. Nous avons choisi d'utiliser pour cela les amorces Lionel Martignat

- glycoprotéine B (LM-gB) (Séquences confidentielles car non encore publiées). Elles ciblent le gène de la glycoprotéine B de l'Herpès Virus Canin et ont été validées par différentes études antérieures de l'équipe de recherche (Charles *et al.*, 2022 ; ESAR Nantes 2024).

Afin de réaliser cette analyse PCR EvaGreen® plusieurs étapes sont nécessaires. Ces étapes sont réalisées selon le MO-8 (Annexe 8) et respectent le principe de la marche en avant, permettant normalement de limiter au maximum les contaminations en cours des manipulations. Ces contaminations se produisent lorsqu'un échantillon est accidentellement exposé à de l'ADN, provenant des autres échantillons ou de PCR précédentes, et entraînent donc un risque accru de résultats faux positifs. La méthode de marche en avant aide à éviter ces contaminations en séparant physiquement les étapes de préparation des échantillons, d'amplification et de manipulation des produits de PCR, minimisant ainsi les risques de contamination croisée. Des témoins négatifs viennent confirmer l'absence d'ADN cible circulant.

La première étape consiste en la réalisation du mélange réactionnel de la PCR. Pour cela au tampon « Hot FIREpol EvaGreen® qPCR mix plus (no ROX) » (référence : 08-25-00001, Solis Biodyne™) sont ajoutés de l'eau de qualité biologique moléculaire ainsi que les amorces sens et anti-sens LM-gB. Ce tampon contient le colorant EvaGreen®, des désoxyribonucléotides triphosphates, du chlorure de magnésium co-facteur de la polymérisation, un tampon et une ADN polymérase thermostable. Une fois le mélange réactionnel complet réalisé dans les quantités adaptées à l'analyse, celui-ci est réparti dans une plaque 96 puits, avec 16 µl de mix par puits.

L'étape suivante consiste à l'ajout dans les puits 4 µl d'échantillon à analyser par puits. Un même échantillon est déposé dans 3 puits consécutifs, formant une « triplicate ». 2 échantillons témoins sont systématiquement analysés, quelques soient les analyses réalisées. Le premier est un témoin négatif, sans matrice, ici de l'eau de qualité biologique moléculaire est utilisée avec le mélange réactionnel complet. Lors de la réaction aucun signal ne doit émettre de fluorescence dans ces puits. Le second témoin est un témoin positif de PCR, composé d'un échantillon d'ADN contenant de l'ADN de CHV-1 dont une précédente analyse PCR a déjà confirmé la présence (par exemple ADN de MDCK infectées par la souche DK13).

La dernière étape consiste en l'analyse PCR de cette plaque. Cette PCR est réalisée sur l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Référence 1855201, de Biorad™), selon le programme suivant :

**Première phase de dénaturation** : 12 minutes à 95°C

Puis 40 cycles de 55 secondes composés comme suit :

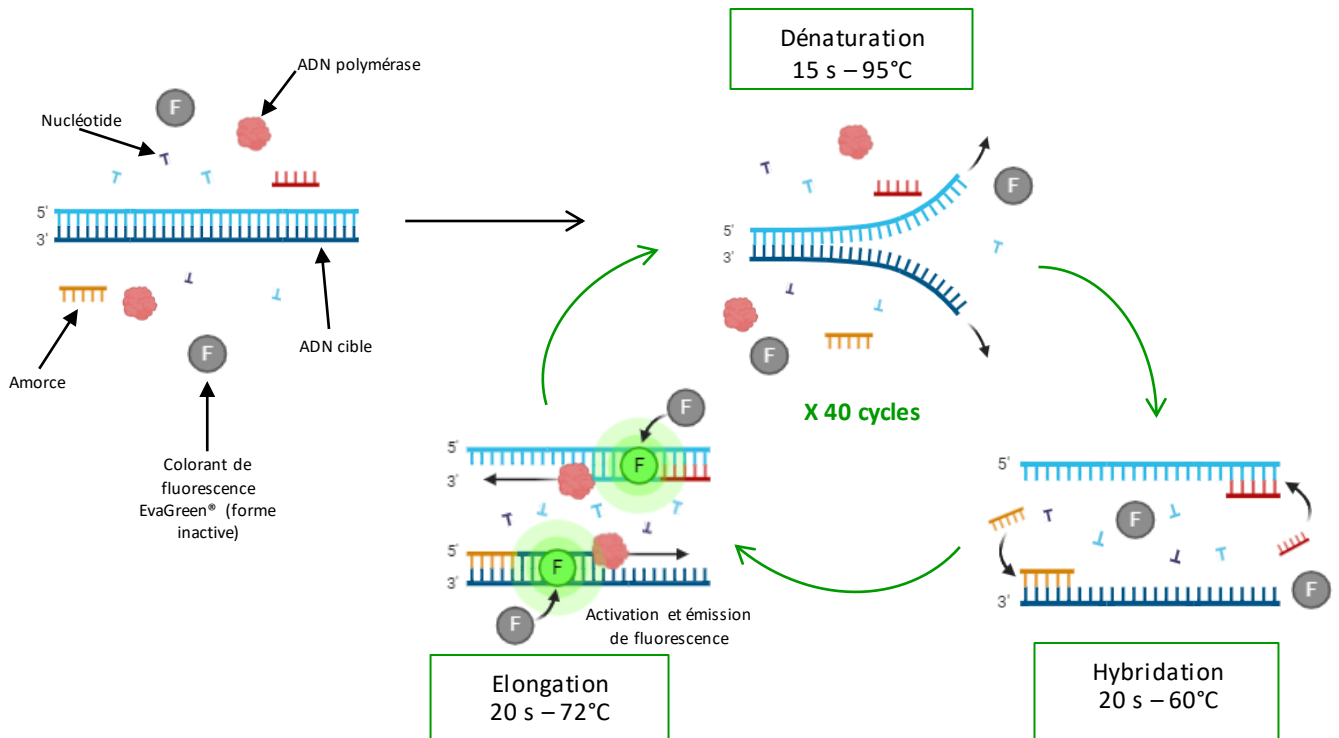
1. **Dénaturation** : 15 secondes à 95°C
2. **Hybridation** : 20 secondes à 60°C
3. **Elongation** : 20 secondes à 72°C

La programmation est effectuée à l'aide du logiciel CFX-BioRad.

Une fois le programme lancé, le thermocycleur mesure l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle. Les résultats sont transmis sous forme de courbes d'amplification (ampliplo). Elles représentent la fluorescence relative émise (Relative fluorescence units, RFU) en fonction du nombre de cycles. Une valeur seuil est indiquée pour les échantillons positifs : le cycle seuil (Ct, Cycle Threshold, appelé maintenant Cq, Quantitative Threshold). Cette valeur permet une analyse semi-quantitative de la quantité de d'ADN viral initialement présente dans l'échantillon. En effet, le Cq correspond au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence dépasse le bruit de fond. Ainsi un Cq élevé indiquera qu'un nombre de cycle important aura été nécessaire pour atteindre une concentration en ADN viral détectable via la fluorescence, ce qui signifie que la concentration en ADN viral initiale était faible dans l'échantillon analysé. A l'inverse, un Cq plus précoce témoignera d'une quantité en ADN viral initiale plus importante. Lorsque la quantité d'ADN analysée en PCR a été standardisée après le dosage, cette comparaison des Cq permet donc une comparaison relative de la quantité d'ADN viral entre différents échantillons.

Prenons un exemple théorique de comparaison d'un échantillon et du témoin positif associé. Le Cq associé au témoin positif est de 20 cycles. L'échantillon testé est positif à la PCR et son Cq associé est de 30 cycles. Cela signifie que le témoin positif utilisé en PCR est beaucoup plus riche en ADN viral que l'échantillon testé. Cette analyse ne nous permet pas d'obtenir une valeur absolue pour quantifier de façon absolue (en nombre de copies par  $\mu\text{g}$  d'ADN, par exemple) l'ADN viral dans notre échantillon. Mais dans des conditions expérimentales identiques il est possible de savoir si l'intensité de l'infection est similaire ou non entre nos échantillons.

En l'absence de fluorescence avant le 40<sup>ème</sup> cycle cela signifie qu'il n'y a pas de virus détectable dans nos conditions (limite inférieure de détection). De plus, une fluorescence détectée à la limite, soit autour du 39<sup>ème</sup> et 40<sup>ème</sup> cycle, est un résultat ambigu, car peut éventuellement correspondre à un artéfact. Il est nécessaire d'interpréter ces résultats avec prudence. Il est également possible d'ajouter une étape d'électrophorèse pour vérifier la présence de l'ADN cible.



*Figure 27 : Principe de la PCR en temps réel EvaGreen® (réalisé avec Biorender.com)*

## 3.2) RESULTATS

### 3.2.1) ETUDE DE LA CAPACITE DES SPERMATOZOÏDES A TRANSMETTRE LE VIRUS (APRES LAVAGE)

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité du virus à pénétrer dans les spermatozoïdes, de s'y répliquer, puis d'infecter des cellules MDCK. Pour cela des spermatozoïdes sont incubés au contact du virus, puis lavés deux fois (ajout du milieu de conservation puis centrifugation avec élimination du surnageant). Ils sont ensuite placés dans des nacelles au-dessus de tapis cellulaire de cellules MDCK.

#### 3.2.1.1) Mesure de la mobilité et du pourcentage de spermatozoïdes progressifs

Les phases spermatiques sont analysées juste après le prélèvement puis après la première phase d'incubation, avant les lavages des culots de spermatozoïdes et leur passage en nacelle.

*Tableau 7 : Mesure de la mobilité et du pourcentage de spermatozoïdes progressifs avant et après incubation en présence ou absence du virus, à l'aide d'un analyseur de semence IVOS (système CASA) ; comparaison de la mobilité et du % de progressifs avant et après incubation.*

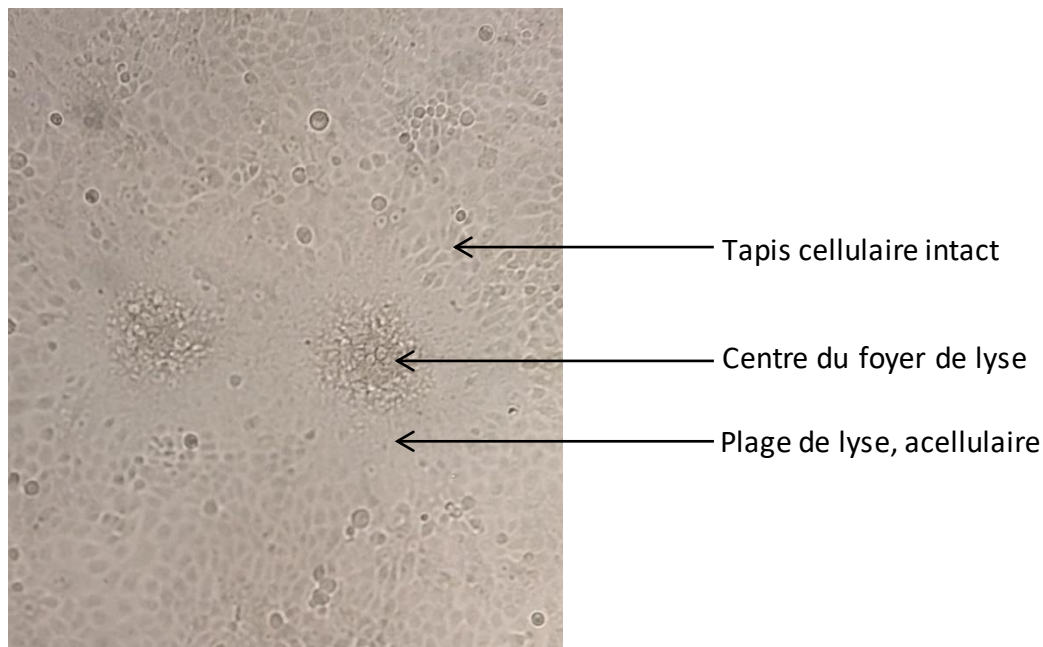
Durée d'incubation		t=0h	t=3h30	
Présence (+) ou absence (-) du virus		-	-	+
Chien 1	Mobilité (%)	47 (100%)	36 (-23%)	17 (-64%)
	% Progressif	10 (100%)	7 (-30%)	4 (-60%)
Chien 2	Mobilité (%)	55 (100%)	26 (-53%)	15 (-73%)
	% Progressif	20 (100%)	4 (-80%)	2 (-90%)

On constate une très forte diminution de la mobilité et du pourcentage de spermatozoïdes progressifs dans les échantillons en présence du virus. Pour le chien 1, on a une diminution de 64% de la mobilité en présence de virus contre une diminution de 23% en l'absence de virus. On retrouve cette même différence avec le % de spermatozoïdes progressifs, avec une diminution de 60% en présence de virus contre seulement 30% en son absence. Pour le chien 2, la mobilité et le % de progressif sont plus fortement impactés après incubation pour les deux échantillons. Néanmoins, on observe toujours une plus forte diminution des deux paramètres pour les spermatozoïdes en contact avec le virus (-73% de mobilité avec le virus contre -53% sans, et -90% de % de spermatozoïdes progressifs avec le virus contre -80% sans). La survie des spermatozoïdes dans nos échantillons est variable selon le donneur, et selon la présence ou l'absence du virus.

### 3.2.1.2) Observation des tapis cellulaires et recherche d'effet cytopathique

Au cours de l'amplification de la plaque 12 puits, les tapis cellulaires sont observés au microscope optique X10 et X40, 2 fois par jour, pour contrôler la confluence des tapis cellulaires et pour rechercher un effet cytopathique du virus.

Lors de l'arrêt de l'incubation les 2 puits correspondant aux témoins positifs d'infection présentaient des signes très clairs : décollement du tapis cellulaire avec de nombreuses cellules en suspension et observation d'un effet cytopathique. Cet effet cytopathique se manifeste par l'apparition de foyers de destruction cellulaire. Au centre de ces foyers, on observe un amas de débris cellulaires, avec encore quelques cellules intactes. En périphérie immédiate, les cellules ont



*Figure 28 : Effet cytopathique du CHV-1 observé sur les tapis de cellules MDCK*

complètement disparu, laissant une zone dépourvue de toute structure cellulaire. Plus loin en périphérie de cette zone atteinte, le tapis cellulaire retrouve une morphologie normale et reste encore intact (voir Figure 28).

Les autres puits sont normaux, particulièrement ceux exposés à des spermatozoïdes ayant été préalablement mis en contact avec le CHV-1 puis lavés 2 fois : le tapis cellulaire est à confluence, avec quelques cellules en suspension et aucun effet cytopathique n'est visible. Les MDCK non infectées (témoins négatifs) présentent également ce type d'aspect.

### 3.2.1.3) Mesure de la concentration en ADN des culots et de leur qualité



Deux types de culots sont extraits en ADN au cours de cette manipulation :

- les culots de spermatozoïdes, récupérés lors du retrait des nacelles après 24h d'incubation
- les culots de cellules MDCK, récupérés lors de l'arrêt de l'amplification de la plaque 12 puits, 40h après le retrait des nacelles.

Une fois ces culots extraits ils sont analysés en spectrophotométrie pour leur pureté et leur concentration en ADN (voir Tableau 8).

Tableau 8 : Qualité et concentration en ADN des extractions pour les culots de spermatozoïdes et les culots de cellules MDCK, mesurées au spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 / 2000c (Thermo Scientific™)

Echantillon	Concentration (ng/μl)	A260/A280
Culot spermatozoïdes Chien 1 -	4,2	3,53
Culot spermatozoïdes Chien 1 +	12,8	1,59
Culot spermatozoïdes Chien 2 -	2,5	4,01
Culot spermatozoïdes Chien 2 +	3,4	3,14
Culot MDCK Témoin -	145,5	2,06
Culot MDCK Chien 1 -	84,7	2,06
Culot MDCK Chien 1 +	175,3	2,06
Culot MDCK Chien 2 -	202,2	2,04
Culot MDCK Chien 2 +	55,1	2,09
Culot MDCK Témoin +	179,3	1,99

On notera le très faible rendement d'extraction sur les culots de spermatozoïdes et également sa mauvaise qualité (ratio inférieurs à 1,8 ou supérieurs à 3).

Pour les culots de cellules MDCK le rapport A260/A280 est légèrement supérieur au rendement théorique attendu (1,8-2,0), mais reste acceptable. La concentration en ADN est conforme à celle attendue pour ce type de culture

Une extraction d'ADN est également réalisée sur les surnageants, mais ni la pureté ni la concentration en ADN ne sont analysées du fait de l'ajout d'ARN carrier.

#### **3.2.1.4) PCR EvaGreen®**

##### *3.2.1.4.1) Analyse des surnageants de lavage des culots de spermatozoïdes*

Après prélèvement du sperme, la phase spermatique est incubée pendant 3h30 au contact du virus. Les échantillons sont ensuite centrifugés. Le surnageant est aliquoté et nommé « SNG

0 », et les culots de spermatozoïdes sont récupérés. Ces derniers sont ensuite lavés deux fois avec le milieu de conservation « Chill LT », les surnageants de lavage sont aliquotés et nommés « SNG 1 » pour le premier lavage et « SNG 2 » pour le second. Ces trois surnageants ont ensuite été extraits en ADN et analysés par PCR (voir Tableau 9).

*Tableau 9 : Nombre de cycle seuil (Cq) en triplicata et température de fusion (Tm) pour les surnageant et lavages des culots de spermatozoïdes. Mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™).*

Echantillon		Cq	Moyenne	Ecart-type	Tm
NTC		Négatif			Aucun
SNG 0	Chien 1 -	Négatif	-	-	Aucun
	Chien 1 +	31,36	31,41	0,23	77,00
		31,20			77,00
		31,66			77,00
	Chien 2 -	Négatif	-	-	Aucun
	Chien 2 +	31,19	30,84	0,49	77,00
		30,49			77,50
Négatif		Aucun			
SNG 1	Chien 2 -	Négatif	-	-	Aucun
	Chien 1 +	36,74	36,79	0,71	77,00
		37,53			77,00
		36,11			77,00
	Chien 2 -	Négatif	-	-	Aucun
	Chien 2 +	35,22	35,56	0,33	77,00
		35,58			77,00
35,87		77,00			
SNG 2	Chien 2 -	Négatif	-	-	Aucun
	Chien 1 +	35,91	36,51	0,85	77,00
		37,11			77,00
		39,78			Aucun
	Chien 1 -	Négatif	-	-	Aucun
	Chien 2 +	Négatif	-	-	Aucun
		39,12	-	-	Aucun
	37,11	-	-	77,00	
Témoin positif de PCR		23,67	23,57	0,09	77,00
		23,52			77,00
		23,52			77,00

Les conditions de la PCR sont validées (NTC négatif et témoin positif de PCR positif, l'amplicon est également validé lorsqu'il y a amplification par les Tm à 77 °C). Les surnageants des échantillons négatifs sont également tous négatifs, il n'y a pas eu de contamination au cours de la manipulation.

Les surnageants d'incubation des spermatozoïdes (SNG 0) des échantillons dits infectés contiennent bien de l'ADN viral (Cq= 31,41(+/- 0,23) et 30,84(+/- 0,49)). De même pour le premier surnageant de lavage (SNG 1) (Cq= 36,79(+/- 0,71) et 35,56(+/- 0,33)). On note également une augmentation du Cq entre le SNG 0 et le SNG 1, ce qui témoigne d'une diminution de la concentration virale. Le deuxième, et dernier surnageant de lavage (SNG 2) contient encore de l'ADN viral, notamment pour le chien 1, où 2 des triplicates sont encore positives. En ce qui concerne le chien 2, seule une des triplicates présente un Cq tardif (Cq = 37,11) accompagné d'un Tm spécifique de l'amplicon viral, ce qui témoigne de la persistance d'ADN viral dans cet échantillon, mais en très faible quantité.

Les lavages sont donc globalement efficaces pour diminuer le nombre de virions présents dans le surnageant des culots de spermatozoïdes après l'incubation.

#### 3.2.1.4.2) Analyse des culots de spermatozoïdes

Les culots de spermatozoïdes sont récupérés des nacelles puis sont analysés en PCR afin de contrôler si le virus a pu y persister au cours de la manipulation.

Tableau 10 : Nombre de cycle seuil (Cq) en triplicata et température de fusion (Tm) pour les culots de spermatozoïdes. Mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad<sup>TM</sup>).

Echantillon	Cq	Tm
NTC	Négatif	Aucun
Culot de spermatozoïdes Chien 1 -	Négatif	Aucun
Culot de spermatozoïdes Chien 1 +	36,86	76,50
	39,34	Aucun
	38,38	Aucun
Culot de spermatozoïdes Chien 2 -	Négatif	Aucun
Culot de spermatozoïdes Chien 2 +	39,81	Aucun
	39,28	Aucun
	38,99	Aucun
Témoin positif de PCR	37,80	76,50
	36,46	76,50
	37,38	76,50

La PCR est valide, en effet le témoin sans matrice est bien négatif et le témoin contenant de l'ADN du virus est clairement positif. Les culots de spermatozoïdes qui n'ont pas été au contact du virus sont bien négatifs à la PCR, il n'y a pas eu de contamination des cellules MDCK lors de la manipulation.

Pour les deux culots de spermatozoïdes ayant été en contact du virus un signal fluorescent tardif est systématiquement détecté (Cq variant entre 38,38 et 39,81) mais n'est pas associé à une température de fusion, ces résultats doivent être considérés comme négatifs (bruit de fond). Seul un puits du culot de spermatozoïdes ayant été au contact du virus du chien 1 (« culot de spermatozoïdes chien 1 + ») est positif, avec un Cq = 36,86 et une Tm = 76,50°C.

Il semble difficile d'affirmer que des virions soient toujours présents dans les culots de spermatozoïdes à la fin de la manipulation. Si c'est le cas, ils le sont en très faible quantité et à la limite de détection, de telle sorte que notre PCR ne soit pas en mesure de le détecter systématiquement.

#### 3.2.1.4.3) Analyse des culots de cellules MDCK

Les culots de cellules MDCK sont récupérés au bout de 40h d'incubation après le retrait des nacelles contenant les spermatozoïdes, puis extraits en ADN et enfin analysés en PCR (voir Tableau 11).

Tableau 11 : Nombre de cycle seuil (Cq) en triplicata et température de fusion (Tm) pour les culots de cellules MDCK. Mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™).

Echantillon	Cq	Moyenne	Ecart-type	TM
NTC	Négatif			Aucun
Culot MDCK Témoin -	Négatif			Aucun
Culot MDCK Chien 2 -	Négatif			Aucun
Culot MDCK Chien 2 +	Négatif			Aucun
Culot MDCK Chien 1 -	Négatif			Aucun
Culot MDCK Chien 1 +	Négatif			Aucun
Culot MDCK Témoin +	37,80	37,21	0,69	76,50
	36,46			76,50
	37,38			76,50

Le culot de cellules MDCK correspondant au témoin positif est positif en PCR, avec un Cq = 37,21. Tous les autres culots sont négatifs. Ces résultats sont concordants avec l'observation des tapis cellulaires et la présence d'un effet cytopathique uniquement sur les deux puits témoins positifs d'infection.

#### *3.2.1.4.4) Analyse des surnageants de culture des cellules MDCK*

Deux des surnageants récupérés lors de l'arrêt de l'amplification de la plaque 12 puits ont été extraits en ADN puis analysés en PCR. Le premier est le surnageant 3 (SNG 3), correspondant au milieu de culture des tapis cellulaires, récupéré directement après l'arrêt de l'amplification. Le second est le surnageant 6 (SNG 6), correspondant au dernier surnageant récupéré après lavage des tapis cellulaire et avant assèchement puis congélation des culots cellulaires. L'analyse du SNG 3 permet d'évaluer la présence possible de virus dans les puits après retrait des nacelles contenant les spermatozoïdes. L'analyse du SNG 6 permettrait selon notre hypothèse de vérifier l'absence de virus dans le milieu lors de la récupération finale des culots de MDCK. Ainsi seule la présence de virus en position intracellulaire pourra être possiblement détectée lors de l'analyse PCR des culots.

Tableau 12 : Nombre de cycle seuil (Cq) en triplicata et température de fusion (Tm) pour les surnageants de culture des cellules MDCK. Mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™).

Echantillon		Cq	Tm
NTC		Négatif	Aucun
SNG 3	Témoin -	Négatif	Aucun
		Négatif	Aucun
		38,59	Aucun
	Chien 2 -	Négatif	Aucun
	Chien 1 -	Négatif	Aucun
	Chien 2 +	Négatif	Aucun
	Chien 1 +	Négatif	Aucun
	Témoin +	36,98	Aucun
		Négatif	Aucun
38,50		Aucun	
SNG 6	Témoin -	Négatif	Aucun
	Chien 2 -	Négatif	Aucun
	Chien 1 -	Négatif	Aucun
	Chien 2 +	Négatif	Aucun
	Chien 1 +	Négatif	Aucun
	Témoin +	Négatif	Aucun
PCR T+	23,90	77,50	
	23,51	77,50	
	22,98	78,00	

Les conditions de la PCR sont validées, les témoins sans matrices étant négatifs et le témoin positif de PCR étant bien positif. Aucun de tous les échantillons analysés n'émet de fluorescence accompagnée d'un Tm spécifique de l'amplicon, ils sont donc tous négatifs. Ceci suggère l'absence de matériel génétique viral y compris pour le témoin positif d'infection et donc suggère l'absence de production de virions dans les surnageants. Ce résultat est en contradiction apparente avec la détection d'un signal PCR positif pour le culot de cellules MDCK du témoin positif d'infection.

### 3.2.2) RECHERCHE D'UN POSSIBLE EFFET VIRUCIDE DU SPERME

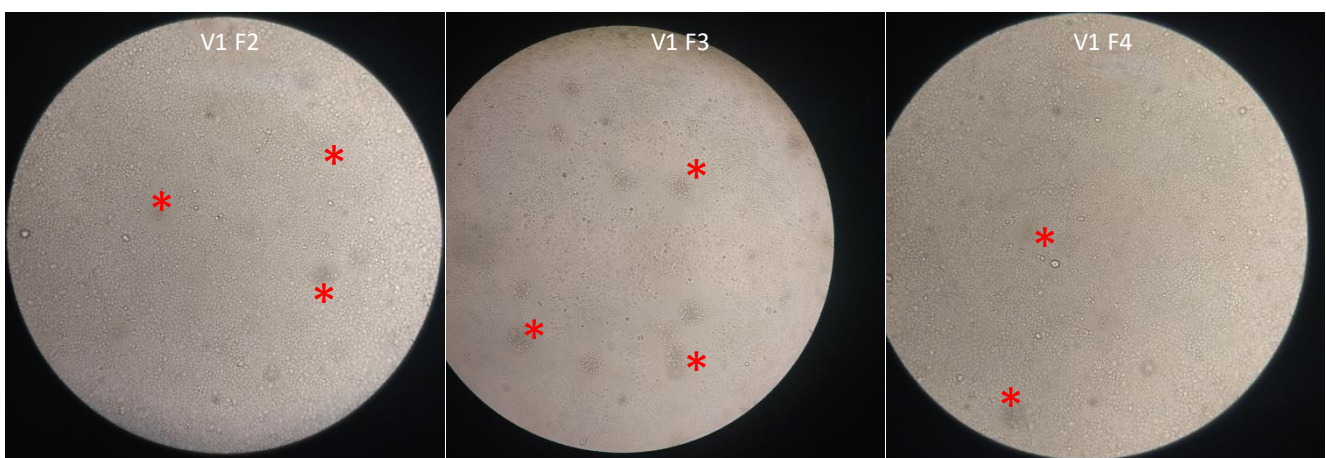
Cette étude consiste en l'incubation du virus au contact de liquide spermatique acellulaire (LSA), puis du passage de cette solution d'incubation sur tapis cellulaire de cellules MDCK. L'objectif étant de comparer l'infection de ces tapis en présence ou en l'absence de LSA.

Deux manipulations ont été réalisées, avec deux LSA de chiens différents. La méthode de décollement des tapis cellulaires a été modifiée entre les deux manipulations. En effet le tapis cellulaire du premier test a été décollé par grattage, ce qui est très agressif vis-à-vis des cellules et entraîne une mortalité très élevée (objectivée en bleu trypan, résultat non présenté). Le second test a été réalisées dans les mêmes conditions jusqu'au décollement du tapis cellulaire qui a été réalisée, lui, par trypsination. La première manipulation a été nommée « V1 » et la seconde « V2 ».

#### 3.2.2.1) Observation des tapis cellulaires et recherche d'un effet cytopathique

Lors de l'arrêt de chaque manipulation toutes les flasques sont observées au microscope optique afin de rechercher un effet cytopathique *a minima* sur le témoin positif (tapis MDCK mis au contact du surnageant viral sans LSA) et pour s'assurer que l'on a une confluence proche de 100% sur le témoin négatif (cellules MDCK sans LSA ni virus).

Pour l'expérience V1, le témoin négatif (F1) ne présente pas de signe d'infection et le tapis cellulaire est à 100% de confluence. Le témoin positif (F2) présente un effet cytopathique (voir paragraphe 3.2.1.1 pour la description), de même que la flasque F3 et la flasque F4. F4 semble présenter moins de signes d'infection, l'effet cytopathique apparaissant moins marqué.

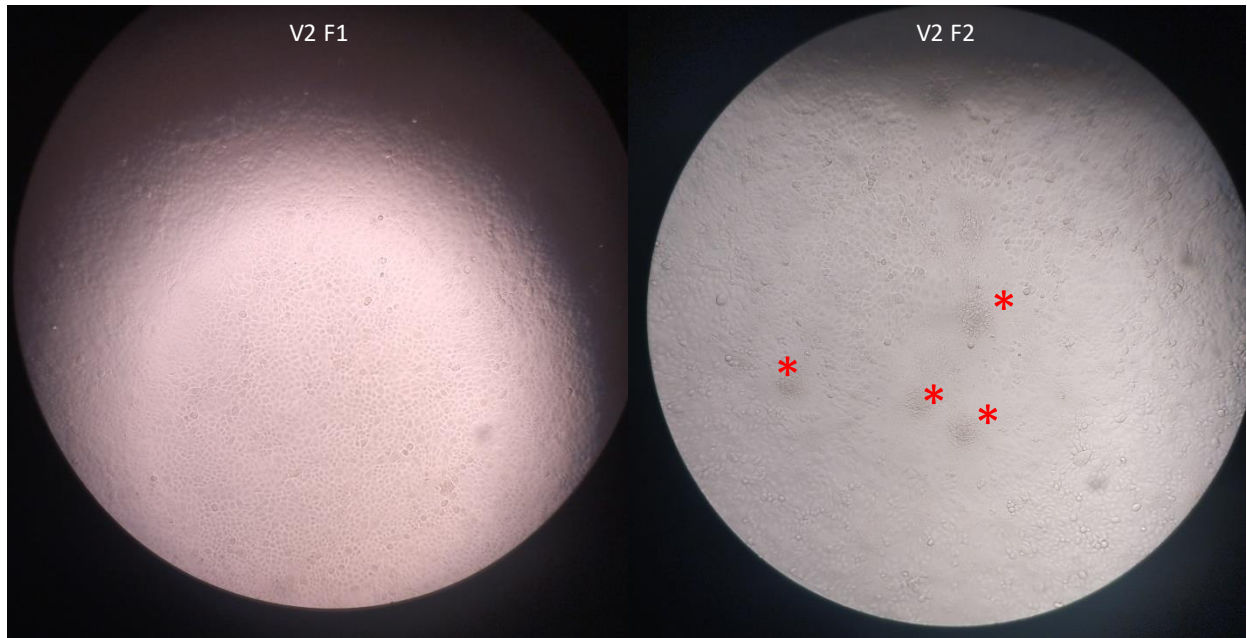


\* Effet cytopathique

Figure 29 : Tapis cellulaires des flasques F2, F3 et F4 de V1 lors de l'arrêt de l'amplification au microscope optique. A gauche : F2 (témoin positif). Au centre : F3 (D10). A droite : F4 (D50). Effet cytopathique visible sur les trois flasques.



Pour l'expérience V2 le témoin négatif (F1) présentait un tapis cellulaire à confluence. Des signes d'infection, avec effet cytopathique, étaient visibles sur le témoin positif (F2). Aucun signe d'infection n'a été visualisé sur F3 ou F4. Ces résultats sont en contradiction avec V1.



\*Effet cytopathique

*Figure 30 : Tapis cellulaires des flasques F1 et F2 de V2 lors de l'arrêt de l'amplification au microscope optique. A gauche : F1 (témoin négatif), le tapis cellulaire est à confluence. A droite : F2 (témoin positif), effet cytopathique du virus sur le tapis cellulaire.*

### 3.2.2.2) Mesure de la concentration en ADN des culots et de leur qualité

*Tableau 13 : Qualité et concentration en ADN des extractions pour les culots de cellules MDCK de V1, V2 et V3. Mesurées au spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 / 2000c (Thermo Scientific™)*

	Echantillon	Concentration (ng/μl)	A260/A280
V1	F1	287,3	2,03
	F2	219,1	2,02
	F3	284,3	1,94
	F4	237,4	1,98
V2	F1	128,2	2,11
	F2	193,5	2,11
	F3	196,9	2,12
	F4	201,5	2,12

L'extraction d'ADN des différents culots est de bonne qualité pour V1. L'extraction d'ADN de V2 est de moins bonne qualité, avec un ratio A260/A280 supérieur à 2,0. Le rendement est satisfaisant et équivalent pour les 2 manipulations.

### 3.2.2.3) PCR EvaGreen®

#### 3.2.2.3.1) Analyse des culots de cellules MDCK

Tableau 14 : Nombre de cycle seuil (Cq) en triplicata et température de fusion (Tm) pour les culots de cellules MDCK. Mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™).

Echantillon		Cq	Tm
NTC		Négatif	Aucun
V1	F1	Négatif	Aucun
	F2	Négatif	Aucun
	F3	Négatif	Aucun
	F4	Négatif	Aucun
V2	F1	Négatif	Aucun
	F2	Négatif	Aucun
	F3	Négatif	Aucun
	F4	Négatif	Aucun
PCR T+		23,19	76,50
		22,99	76,50
		23,10	76,50

Les conditions de la PCR sont validées : les 3 puits sans matrices sortent tous négatifs et les 3 puits du témoin positif de PCR sont positifs. Néanmoins l'ensemble des échantillons analysés sont négatifs.

#### 3.2.2.3.2) Analyse des surnageants

Les trois surnageants récupérés de V2 ont été extraits en ADN puis analysés en PCR. Pour rappel, le SNG 0 correspond au premier milieu de culture contenant le LSA et le surnageant viral et ayant incubé pendant 1h30 sur les tapis cellulaires. Le SNG 1 correspond au milieu de culture récupéré à la fin de l'incubation des flasques. Le SNG 2 correspond au dernier surnageant récupéré avant congélation des culots de cellules.

Tableau 15 : Nombre de cycle seuil (Cq) en triplicata et température de fusion (Tm) pour les surnageants de V2. Mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™).

Echantillon de V2		Cq	Tm
NTC		Négatif	Aucun
SNG 0	F1	Négatif	Aucun
	F2	Négatif	Aucun
		36,37	76,50
		Négatif	Aucun
	F3	36,44	76,50
		Négatif	Aucun
		Négatif	Aucun
F4	Négatif	Aucun	
SNG 1	F1	Négatif	Aucun
	F2	Négatif	Aucun
	F3	Négatif	Aucun
	F4	Négatif	Aucun
SNG 2	F1	Négatif	Aucun
	F2	Négatif	Aucun
	F3	Négatif	Aucun
	F4	Négatif	Aucun
PCR T+		22,89	76,50
		23,44	76,50
		23,14	76,50

Les conditions de la PCR sont validées : les 3 puits sans matrices sortent tous négatifs et les 3 puits du témoin positif de PCR sont positifs. Seuls les échantillons F2 (témoin positif) et F3 (LSA + D10) du SNG 0 sont positifs sur un seul de leur puits. De plus les Cq associés à ces deux signaux sont assez tardifs (supérieur à 36).

Ces résultats de PCR CHV-1 ne sont donc pas en concordance avec les résultats d'effet cytopathique.

### 3.2.3) EVALUATION D'UN POSSIBLE RISQUE D'INHIBITION DE LA PCR PAR LE LIQUIDE SPERMATIQUE ACELLULAIRE (LSA)

#### 3.2.3.1) Evaluation de la sensibilité de la PCR en eau

*Tableau 16 : Nombre de cycle seuil (Cq) moyen pour les dilutions D0 à D6 en eau, mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™)*

Echantillon	Cq						
	D <sub>0</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>
Eau	21,34 (+/- 0,11)	24,04 (+/- 0,06)	27,41 (+/- 0,11)	32,73 (+/- 0,07)	35,34 (+/- 0,48)	-	-

La limite de détection de la PCR EvaGreen® de la gamme mère diluée en eau se situe entre les dilutions D<sub>4</sub> et D<sub>5</sub>, c'est-à-dire entre  $1 \times 10^{-2}$  et  $1 \times 10^{-3}$  ng/ml d'ADN de cellules MDCK infectées par  $3,16 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml. Les dilutions D<sub>5</sub> et D<sub>6</sub> ne seront plus utilisées pour la suite des manipulations.

#### 3.2.3.2) Analyses préliminaires d'une possible inhibition de la PCR par le LSA

Dans une première approche préliminaire deux LSA à différentes dilutions sont testés en PCR avec la gamme mère.

*Tableau 17 : Nombre de cycle seuil (Cq) moyen pour les dilutions D<sub>0</sub> à D<sub>4</sub> mélangées au ½ avec des LSA dilués au 1/5<sup>ème</sup>, 1/20<sup>ème</sup>, 1/40<sup>ème</sup> et 1/100<sup>ème</sup>, mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™)*

Echantillon	Cq				
	D <sub>0</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
Eau	21,34 (+/- 0,11)	24,04 (+/- 0,06)	27,41 (+/- 0,11)	32,73 (+/- 0,07)	35,34 (+/- 0,48)
Dilution 1/5	LSA <sub>1</sub>	-	-	-	-
	LSA <sub>2</sub>	-	-	-	-
Dilution 1/20	LSA <sub>1</sub>	20,14 (+/- 0,04)	-	-	-
	LSA <sub>2</sub>	27,57 (+/- 0,02)	-	-	-
Dilution 1/40	LSA <sub>1</sub>	19,83 (+/- 0,45)	-	-	-
	LSA <sub>2</sub>	21,29 (+/- 0,08)	-	-	-
Dilution 1/100	LSA <sub>1</sub>	21,21 (+/- 0,10)	-	31,04 (+/- 0,47)	-

En gris = non testé

- = PCR négative (Cq > 40 cycles)

On constate une inhibition de la PCR EvaGreen® au contact des LSA. En effet seuls les échantillons contenant la plus grande concentration d'ADN viral (soit les échantillons contenant la dilution  $D_0$ ) sont positifs à la PCR.

Une dilution du LSA au  $1/100^e$  permet de retrouver globalement les valeurs de la gamme en « eau ». Aucune des dilutions d'ADN de MDCK infectées testées ne permet de mesurer un Cq en présence d'une dilution au  $1/5$ , cela pour les deux LSA testés. Tout se passe comme si le virus présent « disparaissait totalement » ( $Cq > 40$  cycles).

Une dilution intermédiaire au  $1/20^e$  du LSA donne des résultats différents selon le donneur de sperme lors de l'analyse avec  $D_0$ . Le LSA<sub>1</sub> dilué au  $1/20^e$  permet de retrouver un Cq proche de la gamme eau tandis que la même dilution du LSA<sub>2</sub> montre un Cq beaucoup plus élevé, indice d'une moindre « quantité de virus » détectée par la PCR temps réel.

Ces éléments sont fortement en faveur d'une inhibition par le LSA de chien de la PCR CHV-1 ultrasensible.

De plus, il semblerait que l'augmentation de la dilution du LSA permette de diminuer l'effet inhibiteur de ce dernier sur la PCR. En effet un signal positif est retrouvé pour la dilution  $D_2$  lorsqu'elle est associée avec le LSA<sub>1</sub> dilué au  $1/100^{ème}$ .

### **3.2.3.3) Analyse d'une possible inhibition de la PCR par le LSA et variabilité interindividuelle**

Après avoir constaté que l'inhibition de la PCR EvaGreen® diminuait lorsqu'on augmentait la dilution des LSA ajoutés à la gamme mère ( $n=2$ ), des dilutions de 3 nouveaux LSA ont été testées. L'objectif étant d'augmenter le nombre de LSA testés et d'évaluer si une très forte dilution permettait de retrouver systématiquement un signal PCR (Cq) identique en LSA qu'en eau.

De plus 6 LSA ont été testés dans ces mêmes conditions pour évaluer d'éventuelles variations interindividuelles d'inhibition entre les LSA.

*Tableau 18 : Nombre de cycle seuil (Cq) moyen pour les dilutions D<sub>0</sub>, D<sub>2</sub> et D<sub>4</sub> mélangées au ½ avec des LSA dilué au 1/50<sup>ème</sup>, 1/200<sup>ème</sup> et 1/500<sup>ème</sup>, mesurés par l'appareil CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Biorad™)*

		Cq		
Echantillon		D <sub>0</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>4</sub>
Eau		21,34 (+/- 0,11)	27,41 (+/-0,11)	35,34 (+/-0,48)
Dilution 1/50	LSA <sub>3</sub>	21,32 (+/- 0,01)	31,42 (+/- 0,35)	-
	LSA <sub>4</sub>	-	-	-
	LSA <sub>5</sub>	22,26 (+/- 0,54)	-	-
	LSA <sub>6</sub>	22,56 (+/- 0,04)	-	-
	LSA <sub>7</sub>	21,53 (+/- 0,21)	-	-
	LSA <sub>8</sub>	21,38 (+/- 0,06)	-	-
Dilution 1/200	LSA <sub>3</sub>	22,36 (+/- 0,01)	29,00 (+/- 0,26)	-
	LSA <sub>4</sub>	22,42 (+/- 0,16)	-	-
	LSA <sub>5</sub>	22,41 (+/- 0,25)	27,80 (+/- 0,16)	-
	LSA <sub>6</sub>	22,35 (+/- 0,11)	29,79 (+/- 0,81)	-
	LSA <sub>7</sub>	20,90 (+/- 0,14)	27,70 (+/- 0,02)	-
	LSA <sub>8</sub>	21,00 (+/- 0,01)	27,60 (+/- 0,05)	36,82 (+/- 0,21)
Dilution 1/500	LSA <sub>3</sub>	22,48 (+/- 0,01)	28,70 (+/- 0,16)	-
	LSA <sub>4</sub>	22,54 (+/- 0,11)	28,82 (+/- 0,20)	-
	LSA <sub>5</sub>	22,45 (+/- 0,12)	28,00 (+/- 0,01)	38,23 (+/- 0,40)
	LSA <sub>6</sub>	22,45 (+/- 0,12)	27,75 (+/- 0,13)	35,34
	LSA <sub>7</sub>	20,88 (+/- 0,06)	27,69 (+/- 0,31)	35,51 (+/- 1,08)
	LSA <sub>8</sub>	20,79 (+/- 0,01)	27,58 (+/- 0,01)	36,06 (+/- 1,12)

- = PCR négative (Cq > 40 cycles)

Il semble qu'il n'y a pas, ou très peu, d'effet inhibiteur des LSA lorsque la quantité d'ADN viral est importante (D<sub>0</sub>). En effet, à l'exception du LSA<sub>8</sub> à la dilution 1/50, tous les échantillons contenant D<sub>0</sub> sont positifs en PCR, sans différence significative avec D<sub>0</sub> en eau.

L'inhibition de la PCR est marquée à la dilution 1/50. Une inhibition persiste à la dilution 1/200 notamment pour les faibles concentrations virales (D<sub>2</sub> et D<sub>4</sub>). Cette inhibition est encore présente pour quelques échantillons à la dilution 1/500 avec l'échantillon le plus faiblement concentré en ADN (D<sub>4</sub>).

Nos résultats montrent clairement que tous les LSA n'inhibent pas la PCR EvaGreen® avec la même intensité. Notamment le LSA<sub>4</sub> est celui qui possède l'effet inhibiteur le plus marqué. C'est

le seul LSA qui, dilué au 1/50<sup>ème</sup>, inhibe totalement la PCR même avec la plus grande concentration d'ADN viral ( $D_0$ ). C'est également le seul qui, dilué au 1/200<sup>ème</sup>, inhibe totalement la PCR avec la concentration intermédiaire en ADN viral ( $D_2$ ). Le LSA<sub>8</sub> semble avoir un effet inhibiteur moins marqué, car c'est le seul pour qui la détection de l'ADN viral a été possible pour la plus faible concentration à la dilution 1/200.

Il est important de noter néanmoins que même dilué au 500<sup>e</sup>, et cela pour la dernière dilution que nous avons utilisée ( $D_4$ ), 2 LSA sur 6 sont capables de bloquer la détection du virus pourtant bien présent.

### **3.3) DISCUSSION**

Dans ce travail expérimental, nous avons exploré trois axes majeurs concernant le risque de transmission de l'Herpèsvirus canin (CHV-1) par le chien mâle reproducteur. Premièrement, nous avons examiné la capacité des spermatozoïdes à transmettre le virus, notamment après des lavages successifs. Deuxièmement, nous avons étudié la possibilité d'une interaction virucide entre le virus et le sperme canin. Enfin troisièmement, nous avons évalué le risque d'inhibition de la PCR par le sperme, et en particulier par le liquide spermatique.

L'objectif de cette discussion est de revenir sur les résultats obtenus dans chacun de ces trois domaines et de les analyser. Nous verrons également quelles sont les informations que nous apportent ces résultats sur le risque de transmission du CHV-1 par le chien mâle au cours de la reproduction.

#### ***3.3.1) ETUDE DE LA CAPACITE DES SPERMATOZOÏDES A TRANSMETTRE LE VIRUS APRES LAVAGE***

L'analyse de la mobilité et du pourcentage de spermatozoïdes progressifs avant et après incubation dans une étuve à 37°C + 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu de conservation, montre une plus forte diminution de ces deux paramètres pour les spermatozoïdes au contact du virus. Cette diminution plus marquée est compatible avec un effet toxique du CHV-1 sur les spermatozoïdes.

L'analyse des surnageants récupérés entre les deux lavages des culots de spermatozoïdes démontre une réduction du signal d'amplification des séquences virales qui suggère une dilution du virus. Il y a encore de l'ADN viral dans le surnageant du dernier lavage. Les lavages sont efficaces pour diminuer la concentration d'ADN viral dans les culots de spermatozoïdes. Cependant, 2 lavages sont peut-être en nombre insuffisant pour éliminer tous les virus, ou la technique de lavage n'est pas suffisamment adaptée. Le lavage des spermatozoïdes est couramment utilisé pour réduire le risque de transmission du HIV chez l'Homme lors de fécondation assistée. Ce lavage est composé de plusieurs étapes. La première étape consiste en un lavage avec gradient de densité. Le sperme est mélangé avec un milieu de culture, puis centrifugé à travers un milieu permettant une séparation des différents composés du sperme. Le culot de spermatozoïdes obtenus est remis en suspension avec le même milieu de culture puis de nouveau centrifugé. La seconde étape est une technique de migration ascendante. Le culot de spermatozoïdes est incubé pendant 1h à 37°C dans le milieu de culture. Les spermatozoïdes viables migrent à la surface, d'où ils sont récupérés (Semprini et al. 1992; 2013; Zafer et al. 2015).



L'extraction d'ADN à partir des culots de spermatozoïdes après incubation dans les nacelles au-dessus des tapis cellulaires est de qualité médiocre et le rendement est très faible. Lors de l'analyse PCR de ces culots, seul un puits du « chien 1 + » est positif, avec un signal tardif (Cq = 36,86). Il est donc difficile d'affirmer que le virus est toujours présent dans ces culots, ou du moins s'il y est présent c'est en très faible quantité. Néanmoins, il faut considérer que les culots de spermatozoïdes sont analysés après 24h d'incubation. Cela signifie qu'au début de cette incubation ils sont très probablement en bien meilleur état. Si le virus est capable de les infecter, on peut raisonnablement supposer qu'ils sont alors à même de transmettre ce dernier au tapis de cellules MDCK. Ceci ne semble pas être le cas. En effet, l'observation au microscope optique des tapis cellulaires ne révèle pas de signe d'infection sur les puits ayant reçu des culots de spermatozoïdes préalablement incubés avec le virus. Seul le témoin positif d'infection présente un effet cytopathique très net. Cette observation est confirmée par l'analyse PCR des culots où seul le culot de cellules MDCK du témoin positif est présente un signal clair d'amplification de séquences virales.

L'analyse du surnageant correspondant au milieu de culture des tapis cellulaires (SNG3) est en contradiction apparente avec le témoin positif PCR positif sur culot cellulaire de MDCK. En effet, on s'attendrait à y détecter également l'ADN viral. L'infection est probablement à un niveau trop faible même si non ambiguë du fait de l'effet cytopathique observé sur les tapis cellulaires.

Selon notre étude les spermatozoïdes ne semblent pas être infectés par le virus, mais on peut supposer que les virions y adhèrent parfois de façon réversible, comme c'est le cas du BoHV-1 (Tanghe et al. 2005). Néanmoins il ne peut être exclu que notre test puisse être à la limite de sensibilité. Même s'il est convergent pour deux analyses de spermatozoïdes de chiens différents, il devra être reproduit dans des conditions permettant une meilleure viabilité des spermatozoïdes lors du test, une plus grande quantité exploitable après le passage sur plaques de MDCK et un résultat PCR sur témoin positif plus marqué.

Une autre limitation à ce travail est le fait qu'on ne peut affirmer avec l'analyse PCR que la détection du génome (ou d'une partie de celui-ci) qui n'implique pas systématiquement la présence de particule virale infectieuse. En effet, l'analyse sera également positive en présence de débris de génome viral, témoins de la présence de débris viraux. Néanmoins, des Cq précoces suggèrent fortement la présence associée de virions.

Bien que certaines études aient observé certains herpèsvirus en position intracellulaire chez d'autres espèces que le chien (Elazhary et al. 1980; Bocharova et al. 2007; Naumenko et al. 2011), nos résultats n'ont pas confirmé cette observation dans le cadre du CHV-1. En effet, aucune infection intracellulaire n'a pu être mise en évidence dans notre modèle expérimental. Cette divergence pourrait être attribuée à des différences biologiques interspécifiques, telles que des particularités dans la structure des spermatozoïdes ou l'absence de récepteurs membranaires spécifiques au CHV-1. Il est néanmoins important de souligner que les études portant sur ce sujet, quelle que soit l'espèce, sont peu nombreuses et sont peu récentes.

Le lavage des spermatozoïdes semblent prometteur dans sa capacité à éliminer le virus adhérent aux spermatozoïdes. Ce résultat est important car cela signifie que le sperme infecté par le CHV-1 de chiens de haute valeur génétique pourrait toujours être utilisé lors d'inséminations artificielles, après lavage. Il faudra pour cela valider un protocole de lavage totalement efficace.

Cette étude est basée sur la détection par PCR de l'ADN viral après extraction d'ADN total à partir de culot cellulaire ou à partir de liquide (surnageants, lavages). La PCR en temps réel utilisant le colorant EvaGreen® permet de détecter spécifiquement l'ADN du CHV-1, dans divers échantillons biologiques. Toutefois, un résultat positif ne prouve pas nécessairement la présence de virions intacts. Cela pourrait également indiquer la présence de débris de génome viral. Pour déterminer si le virus est intègre et en phase de réplication, il serait par exemple possible de vérifier la présence d'ARN, ce qui implique une étape de transcription inverse (RT-PCR). En effet, l'ARN est suffisamment labile pour que sa détection soit associée effectivement à une phase active de multiplication virale, c'est-à-dire qu'elle soit bien consécutive à une infection des cellules cibles par des virions « intègres ». Néanmoins si dans un test en PCR sur ADN total, en fonction du temps, on détecte une augmentation du Cq (ou son absence de diminution) pour un échantillon donné, cela suggère fortement que des virions sont bien présents. A l'inverse, une augmentation de Cq en fonction du suivi des échantillons d'un test suggère soit la disparition de virions, soit la disparition de débris de génome viral. A remarquer néanmoins que si des débris de génome viral sont détectés (en lieu et place de virions « intègres »), cela signifie qu'initialement le virus était présent dans le sperme mais qu'il a ensuite été détruit.

Grâce à la RT-PCR il serait donc possible d'étudier les culots de spermatozoïdes après incubation avec le virus afin de rechercher si de l'ARN du CHV-1 y est présent. Selon nos premiers

résultats, l'hypothèse serait qu'il n'y ait pas de réplication active au sein des spermatozoïdes et donc que l'on ne puisse pas détecter d'ARN viraux.

L'utilisation d'immunofluorescence serait également une piste intéressante dans l'étude de la relation entre le virus et les spermatozoïdes. Celle-ci permettrait une localisation des antigènes viraux autour ou dans le spermatozoïde. Elle a permis de localiser le BoHV-1 dans le liquide séminal et au niveau de la tête des spermatozoïdes chez le taureau (Elazhary et al. 1980). Néanmoins, cette technique ne permet pas d'évaluer la capacité infectieuse du virus, ni d'évaluer sa capacité à pénétrer au sein du spermatozoïde.

La localisation précise du virus dans le spermatozoïde serait possible via l'utilisation d'un microscope électronique. Cette technique a permis de localiser le HCMV dans le spermatozoïde humain (Naumenko et al. 2011). Cette technique reste complexe de réalisation et peu accessible en pratique.

Dans notre étude nous avons cherché à identifier si le CHV-1 pouvait se répliquer dans le spermatozoïde et infecter de nouvelles cellules à partir de ce dernier. Pour cela l'isolement viral combiné à une analyse PCR reste la technique de choix, notamment du fait de son accessibilité et de sa sensibilité. Nos résultats préliminaires sont les premiers dans ce domaine chez le chien, la reproduction de notre expérience est nécessaire pour valider ces résultats.

### **3.3.2) RECHERCHE D'UN POSSIBLE EFFET VIRUCIDE DU SPERME**

La recherche d'un possible effet virucide du sperme a été réalisée à 2 reprises (n=2 LSA de chiens différents testés). L'observation des tapis cellulaire en fin d'incubation des flasques révèle pour la première manipulation (V1) la présence d'effet cytopathique net sur la flasque témoin positif (F2), aussi bien que sur les deux flasques tests (F3 et F4). Ceci suggère l'absence d'effet virucide ou un effet très limité. A l'inverse, l'observation des tapis cellulaires de la deuxième manipulation (V2) ne révèle la présence d'un effet cytopathique que sur la flasque témoin positif (F2). Il semblerait donc que le LSA utilisé pour V2 ait empêché l'infection des cellules MDCK. La principale différence entre les deux manipulations est l'origine des LSA utilisés. En effet, les deux LSA ne provenaient pas du même chien. Il existe peut-être des variations interindividuelles dans la composition du sperme du chien desquelles découleraient des interactions sperme-virus variables.

Cet effet inhibiteur de l'infection virale du sperme sur les herpèsvirus a déjà été mis en évidence chez l'homme. Notamment, un composé provenant du liquide prostatique est suspecté comme ayant un effet antiviral sur les HSV (Chen et al. 2021). De plus, lors d'une étude portant sur

les interactions entre le sperme humain et le HCMV, il a été montré que le liquide séminal était en mesure d'inhiber l'activité du cytomégalovirus humain, avec une action dose-dépendante. Il a été également montré qu'il existait des variations de cet effet selon les donneurs de sperme (Lippold et al. 2019). Mais la nature exacte de ces composés n'est pas encore identifiée. Il est probable que de tels composés existent chez le chien, en quantité variable également selon les individus. On peut émettre l'hypothèse que ces variations soient génétiques, mais il est envisageable qu'elles dépendent également de l'environnement dans lequel le chien évolue. Ainsi, on peut supposer que le sperme d'un chien, ayant été préalablement en contact avec le CHV-1, présente un effet virucide lié à une réponse antivirale spécifique.

De façon très surprenante, et malheureusement, les analyses PCR des culots de cellules MDCK n'ont pas donné de résultats exploitables. En effet, l'ensemble des échantillons étaient négatifs, y compris les culots des témoins positifs, malgré l'observation d'un effet cytopathique net, témoin d'une activité virale incontestable. De plus, lors de l'analyse PCR du surnageant correspondant aux solutions d'incubation après passage sur tapis cellulaire (SNGO) de V2, seul un des puits de F2 et un des puits de F3 sont positifs, avec un signal tardif ( $Cq = 36,37$  et  $Cq = 36,44$ ). L'absence d'analyse PCR fiable ne nous permet pas de comparer, d'un point de vue semi-quantitatif, l'intensité de l'infection observée pendant l'expérience V1. Il n'est pas possible de savoir si la présence de LSA au cours de cette manipulation a pu inhiber partiellement l'infection, si elle l'a amplifiée ou si la présence du LSA n'a eu aucun impact sur l'infection. Nous n'avons pas d'explication à ce résultat de PCR négatif, pour une technique très sensible et que nous maîtrisons parfaitement. Il est probable qu'il y a eu des problèmes soit d'échantillonnage, de traçabilité, ou liés à la technique. Il sera important donc de reprendre ces manipulations en validant chaque étape.

Ainsi ces résultats très préliminaires orientent vers un possible effet virucide au moins de certains spermatozoïdes, avec des variations interindividuelles importantes. Néanmoins de nouvelles manipulations sont nécessaires pour le vérifier.

Lors de la reproduction de ces manipulations, différents LSA devront être testés afin de vérifier si une variabilité interindividuelle est bien présente. De même il serait intéressant de tester le LSA de chiens qui ont été infectés par le CHV-1, par rapport au LSA de chiens qui n'ont jamais été en contact avec le virus.

Différentes concentrations virales pourront être utilisées, notamment pour s'assurer que celles utilisées lors de nos premières expériences ne sont pas trop élevées en virions. L'objectif serait de se rapprocher le plus possible d'un titre viral équivalent à ceux trouvés dans le sperme de chien sur le terrain.

Enfin, il serait intéressant de réaliser cette expérience avec les différentes fractions spermatiques. En effet, lors de nos manipulations, seul le LSA de la phase spermatique, éventuellement mélangé avec le LSA de la phase prostatique, a été utilisé. La composition du sperme varie selon la fraction, le possible effet virucide identifié lors de nos recherches n'est peut-être pas le même selon la fraction dont il provient. Notamment, différents composés du sperme humain ont été suspectés comme ayant un effet inhibiteur de l'infection de certains virus, dont un composé issu du liquide prostatique qui inhiberait l'infection par les HSV (Chen et al. 2021).

### **3.3.3) EVALUATION D'UN POSSIBLE RISQUE D'INHIBITION DE LA PCR PAR LE LIQUIDE SPERMATIQUE ACELLULAIRE (LSA)**

Lors de cette étude, des dilutions sériées d'ADN de cellules MDCK infectées par le virus ont été réalisées. Elles ont ensuite été diluées en eau puis analysées en PCR. Cette première étape a permis d'identifier la limite de détection de la PCR sur cette gamme. Elle se situe, avec notre échantillon d'ADN extrait d'un surnageant viral, entre la dilution D<sub>4</sub> et D<sub>5</sub>, soit entre 1x10<sup>-2</sup> et 1x10<sup>-3</sup> ng/ml d'ADN de cellules MDCK infectées par 3,16x10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/ml. Il s'agit d'un modèle d'analyse relatif. En effet, la proportion d'ADN viral par rapport à l'ADN canin de nos échantillons est inconnue. Néanmoins la TCID<sub>50</sub> associée au surnageant dont l'ADN a été extrait est connue, et est associée à une charge virale conséquente, permettant l'obtention très rapide d'un important effet cytopathique.

Ensuite un effet inhibiteur du LSA sur la PCR a été mis en évidence pour des dilutions de LSA allant de 1/5<sup>ème</sup> à 1/100<sup>ème</sup>. Lors de cette étape préliminaire seule la plus forte concentration en ADN viral (D<sub>0</sub>) est détectée. Il n'y a qu'à partir de la dilution au 1/100<sup>ème</sup> que la concentration D<sub>2</sub> d'ADN est de nouveau détectée, mais de façon retardée (Cq = 27,41 (+/- 0,11) en eau versus Cq = 31,04 (+/- 0,47) avec le LSA dilué au 1/100<sup>ème</sup>). Cette détection retardée est le témoin d'un effet inhibiteur partiel.

Lors de l'étude de l'inhibition en présence de LSA avec de beaucoup plus fortes dilutions (dilutions au 1/50<sup>ème</sup>, 1/200<sup>ème</sup> et 1/500<sup>ème</sup>) l'effet inhibiteur est très peu présent pour la plus forte concentration virale (sur les 6 LSA, seul le LSA<sub>4</sub> dilué au 1/50<sup>ème</sup> inhibe la PCR avec D<sub>0</sub>). L'effet

inhibiteur est marqué pour les concentrations modérées et faibles en ADN viral ( $D_2$  et  $D_4$ ) avec les LSA dilués au  $1/50^{\text{ème}}$  (seul le LSA<sub>3</sub> permet de détecter un signal PCR retardé en présence de  $D_2$ ). Cet effet inhibiteur est moindre lorsque les LSA sont dilués au  $1/200^{\text{ème}}$  : le signal en présence de  $D_2$  est retrouvé pour tous les LSA sauf le LSA<sub>4</sub>, et un signal est même présent pour le LSA<sub>8</sub> en présence de  $D_4$ . Une dilution encore plus importante des LSA (dilution au  $1/500^{\text{ème}}$ ) permet de diminuer l'effet inhibiteur. En effet, le signal en présence de  $D_2$  est systématiquement retrouvé et est similaire au signal de notre gamme d'ADN de MDCK infectées, pré-diluée en eau. De plus, le signal en présence de  $D_4$  réapparaît pour 4 des LSA sur les 6. Le LSA de tous les chiens testés s'avèrent donc systématiquement inhibiteur de la PCR temps réel spécifique du CHV-1. Une variation de cet effet inhibiteur est constatée entre les LSA. Le LSA<sub>4</sub>, notamment, inhibe de façon marquée la PCR (absence de signal au  $1/50^{\text{ème}}$  avec  $D_0$ , absence de signal au  $1/200^{\text{ème}}$  avec  $D_2$ , absence de signal au  $1/500^{\text{ème}}$  avec  $D_4$ ). A l'inverse le LSA<sub>8</sub> a un effet inhibiteur plus faible que les autres LSA, puisqu'il s'agit du seul LSA pour qui un signal avec  $D_4$  a pu être détecté à la dilution  $1/200^{\text{ème}}$ . Il y a donc une variation interindividuelle de cet effet inhibiteur du sperme sur la PCR.

La présence d'inhibiteurs de la PCR dans le sperme n'a pas encore été décrite chez le chien mais a déjà été identifiée chez d'autres espèces, notamment l'Homme et le bovin (Semprini et al. 1998; Wang et al. 2007). La nature de ces inhibiteurs n'est pas parfaitement identifiée. Plusieurs molécules, dont la lactoferrine, les peroxydes et les résidus contenant du zinc, sont suspectées chez l'Homme (Bourlet et al. 2003).

La mise en évidence de cet effet inhibiteur du LSA, et donc d'une partie du sperme, sur la PCR temps réel, souligne l'importance d'adopter des méthodes qui permettent de supprimer cette inhibition. En effet, il est important de limiter le plus possible le nombre de résultats faux négatifs lors d'analyses PCR sur le sperme.

Pour ce faire la dilution des échantillons semble être une piste intéressante. Comme vu précédemment, la dilution du LSA permet de diminuer l'effet inhibiteur et de retrouver un signal pour des concentrations fortes à modérées, et même pour de faibles concentrations d'ADN de cellules MDCK infectées par le CHV-1. Ici, de fortes dilutions de LSA ont été nécessaires pour atteindre la même sensibilité de la PCR temps réel qu'avec notre gamme d'ADN de MDCK infectées diluée en eau. L'inconvénient de cette technique sur le terrain est le risque de diluer trop fortement l'échantillon et de passer en dessous du seuil de détection de la PCR. En effet, comme

le montre la gamme de dilution en eau, la PCR ne peut détecter la présence d'ADN viral si la concentration de ce dernier est insuffisante dans l'échantillon (en eau entre les dilutions  $D_4$  ( $D_0$  à la dilution  $10^4$ ) et  $D_5$  ( $D_0$  à la dilution  $10^5$ )). Ainsi une trop forte dilution de l'échantillon à analyser est susceptible d'entraîner également des résultats faussement négatifs.

Néanmoins dans le cadre de notre étude, le LSA est rajouté après l'étape d'extraction d'ADN et, bien que cette technique ait permis de confirmer l'existence d'un effet inhibiteur du LSA sur la PCR, cette situation ne devrait pas se rencontrer lors d'analyses d'échantillons de terrain. En effet, la recherche de virus par PCR sur le sperme nécessite que l'étape d'extraction d'ADN soit réalisée directement sur ce même échantillon. Les inhibiteurs seront donc dilués lors des processus d'extraction.

A ce stade, une étude de l'effet inhibiteur du sperme après les étapes d'extraction d'ADN est nécessaire. Le niveau de dilution de l'échantillon, suffisant pour supprimer l'effet inhibiteur, pourra être évalué. Si la dilution nécessaire est trop importante, car elle entraîne un risque de faux négatif par dilution excessive du virus, alors une autre technique de suppression de l'inhibition sera nécessaire. Parmi ces techniques l'utilisation d'une colonne Sephacryl lors de l'extraction d'ADN a démontré son efficacité par rapport à d'autres méthodes (Da Silva et al. 1995; Rocha et al. 1998). L'utilisation d'une méthode encore plus sensible que le PCR temps réel peut également être envisagée, telle que la ddPCR (Taylor, Laperriere, Germain 2017; Yu et al. 2022). Il peut également être intéressant de savoir si le LSA analysé présente un fort taux d'inhibiteurs. Pour cela plusieurs stratégies sont envisageables. Un contrôle interne peut être utilisé, permettant d'identifier la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon, ou l'amplification d'un gène domestique peut être réalisée (World Organisation for Animal Health 2014). Ces deux stratégies nécessitent de posséder un contrôle interne pouvant être amplifié par nos amorces ou d'amorces permettant l'amplification du gène domestique choisi. Une alternative est possible. Elle consiste à analyser deux fois l'échantillon de terrain. La première analyse est une analyse classique, avec éventuellement une dilution préalable à l'extraction d'ADN, puis une analyse PCR. La deuxième analyse consiste à ajouter à l'échantillon analysé une quantité définie d'une solution contenant de l'ADN viral. Si le signal PCR est absent ou retardé lors de cette deuxième analyse, cela témoigne de la présence d'inhibiteur dans l'échantillon et que le résultat de la première analyse ne peut être interprété dans ces conditions. Cette stratégie a été mise en place chez l'Homme ou le taureau pour valider les résultats PCR négatifs (Semprini et al. 1998; Rana et al. 2011).

La mise en évidence de cet effet inhibiteur du sperme sur la PCR ne remet pas en question les résultats préalablement décrits, en particulier dans les deux volets d'étude précédents (infection de spermatozoïdes et étude d'un possible effet virucide).

En effet, lors de l'étude de la capacité de transmission des spermatozoïdes après lavage, le LSA n'est pas conservé et les surnageants préliminaires sont bien positifs en PCR. Seuls sont conservés les culots de spermatozoïdes, qui subissent plusieurs lavages (permettant ainsi une dilution déjà significative des éventuels inhibiteurs restants). Ces inhibiteurs sont de nouveau dilués lors de l'extraction d'ADN. Ces culots sont de nouveau rincés avant d'être analysés en PCR.

Lors de l'étude de la possible capacité virucide du LSA, ce dernier est déposé sur les tapis cellulaires pour une première incubation, puis rincé avant que les tapis ne soient remis en incubation. Seules ces solutions d'incubation contenant le LSA (SNGO) peuvent être à l'origine d'une inhibition de la PCR puisqu'elles ne sont pas diluées avant. Les tapis sont également lavés de nouveau avant d'être récupérés lors de la fin de la seconde incubation. Les inhibiteurs initialement présents dans le LSA ont donc été éliminés pour la plus grande partie et très fortement dilués.



## CONCLUSION

L'objectif principal de ce travail était d'étudier la relation entre le CHV-1 et le sperme afin de mieux caractériser le risque de transmission par le chien mâle en reproduction. Pour cela nous avons travaillé sur trois axes. Le premier porte sur la capacité des spermatozoïdes à transmettre le virus (en particulier après lavages). Le second volet de recherche étudie, lors d'une éventuelle interaction entre le sperme et le virus, si le sperme canin possède une capacité virucide. Le troisième axe évalue le risque de ne pas détecter un reproducteur porteur du virus lors d'une analyse PCR à cause d'inhibiteurs présents dans le sperme.

La détection d'ADN viral dans le sperme du chien suggère un risque de transmission à la femelle lors de la reproduction. Dans notre modèle d'infection *in vitro*, nos résultats préliminaires montrent une absence d'infection des tapis cellulaires MDCK par des spermatozoïdes préalablement infectés, puis lavés (n=2). L'absence à la fois d'effet cytopathique et de détection de CHV-1 par PCR temps réel suggèrent que le virus ne serait pas en mesure de pénétrer et de se répliquer au sein des spermatozoïdes. Il pourrait néanmoins adhérer temporairement à sa surface. Le principe de lavages multiples des spermatozoïdes diminuerait efficacement le titre viral comme en témoigne l'augmentation des Cq au fil des lavages. Reste à déterminer si un nombre minimum de lavages permet à coup sûr d'éliminer les virus adhérents.

L'étude très préliminaire (n=2) d'un possible effet virucide du sperme n'est pas concluante et nécessite de nouvelles expériences. En effet, le résultat de l'observation des tapis cellulaires, après incubation en présence de liquide spermatique acellulaire (LSA) et de virus, est contradictoire entre les deux expériences. Si l'une oriente vers un effet virucide, la seconde n'en présente pas. Cette différence pourrait reposer sur une différence de composition entre les deux LSA testés. De plus, l'absence en PCR de détection, au moins des témoins positifs d'infection, suggère un souci technique ou de recueil d'échantillon.

Le LSA canin est clairement capable d'inhiber la PCR EvaGreen®. Cet effet dépend de la quantité d'ADN viral présente dans l'échantillon testé (nos gammes de dilutions), et peut donc en partie être contré par la dilution du LSA. Cette inhibition par le LSA s'avère aussi variable entre les individus. Ce résultat est important à prendre en compte dans le dépistage des reproducteurs, car il témoigne du haut risque de faux négatifs lors d'analyse PCR sur le sperme.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALI, S., BOBY, N., PREENA, P., SINGH, S.V., KAUR, Gurpreet, GHOSH, S.K., NANDI, S. et CHAUDHURI, P., 2022. Microcapillary LAMP for rapid and sensitive detection of pathogen in bovine semen. *Animal Biotechnology*. novembre 2022. Vol. 33, n° 6, pp. 1025-1034. DOI 10.1080/10495398.2020.1863225.
- ALMBERG, E., MECH, L., SMITH, D., SHELDON, J. et CRABTREE, R., 2009. A Serological Survey of Infectious Disease in Yellowstone National Park's Canid Community. *PLOS ONE*. 16 septembre 2009. Vol. 4, n° 9, pp. e7042. DOI 10.1371/journal.pone.0007042.
- ALTHOUSE, G. C. et ROSSOW, K., 2011. The potential risk of infectious disease dissemination via artificial insemination in swine. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. septembre 2011. Vol. 46 Suppl 2, pp. 64-67. DOI 10.1111/j.1439-0531.2011.01863.x.
- ANGRIMANI, D. S. R., LUCIO, C. F., VEIGA, G. a. L., SILVA, L. C. G., REGAZZI, F. M., NICHI, M. et VANNUCCHI, C. I., 2014. Sperm maturation in dogs: sperm profile and enzymatic antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa. *Andrologia*. 2014. Vol. 46, n° 7, pp. 814-819. DOI 10.1111/and.12154.
- APPEL, M. J., MENEGUS, M., PARSONSON, I. M. et CARMICHAEL, L. E., 1969. Pathogenesis of canine herpesvirus in specific-pathogen-free dogs: 5- to 12-week-old pups. *American Journal of Veterinary Research*. décembre 1969. Vol. 30, n° 12, pp. 2067-2073.
- AQUINO-CORTEZ, A., PINHEIRO, B.Q., LIMA, D., SILVA, H.V.R., MOTA-FILHO, A.C., MARTINS, J.A.M., RODRIGUEZ-VILLAMIL, P., MOURA, A.A. et SILVA, L.D.M., 2017. Proteomic characterization of canine seminal plasma. *Theriogenology*. 1 juin 2017. Vol. 95, pp. 178-186. DOI 10.1016/j.theriogenology.2017.03.016.
- BAGASRA, O., PATEL, D., BOBROSKI, L., ABBASI, J.A., BAGASRA, A.U., BAIDOURI, H., HARRIS, T., EL-ROEIY, A., LENGVARSKY, Z., FARZADEGAN, H. et WOOD, C., 2005. Localization of human herpesvirus type 8 in human sperms by in situ PCR. *Journal of Molecular Histology*. septembre 2005. Vol. 36, n° 6-7, pp. 401-412. DOI 10.1007/s10735-005-9010-9.
- BARONE, R., 1978. *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3. Splanchnologie. Fascicule 2. Appareil uro-génital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale*. Vigot. Paris. Splanchnologie, Fascicule 2.
- BARRANDEGUY, M. et THIRY, E., 2012. Equine coital exanthema and its potential economic implications for the equine industry. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*. janvier 2012. Vol. 191, n° 1, pp. 35-40. DOI 10.1016/j.tvjl.2011.01.016.
- BART, S.M., COHEN, C., DYE, J.M., SHORTER, J. et BATES, P., 2018. Enhancement of Ebola virus infection by seminal amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 10 juillet 2018. Vol. 115, n° 28, pp. 7410-7415. DOI 10.1073/pnas.1721646115.
- BARTSCH, R. C., HUBSCHLE, O. J. et ELS, H. J., 1974. Canine herpesvirus infection: literature review and case report. *Journal of the South African Veterinary Association*. mars 1974. Vol. 45, n° 1, pp. 81-85.

- BEHBOUDI, E., MOKHTARI-AZAD, T., YAVARIAN, J., GHAVAMI, N., SEYED KHORRAMI, S., REZAEI, F., CHAROSTAD, J., SHATIZADEH MALEKSHAHI, S. et SHAFIEI-JANDAGHI, N.Z., 2019. Molecular detection of HHV1-5, AAV and HPV in semen specimens and their impact on male fertility. *Human Fertility*. 3 avril 2019. Vol. 22, n° 2, pp. 133-138. DOI 10.1080/14647273.2018.1463570.
- BEZOLD, G., SCHUSTER-GRUSSER, A., LANGE, M., GALL, H., WOLFF, H. et PETER, R.U., 2001. Prevalence of human herpesvirus types 1–8 in the semen of infertility patients and correlation with semen parameters. *Fertility and Sterility*. 1 août 2001. Vol. 76, n° 2, pp. 416-418. DOI 10.1016/S0015-0282(01)01920-3.
- BIBRACK, B. et SCHAUDINN, W., 1976. Untersuchungen über das Vorkommen von Herpesinfektionen bei Hunden in der Bundesrepublik Deutschland mit Hilfe eines Neutralisations-Schnelltestes1. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*. 1976. Vol. 23, n° 5-6, pp. 384-390. DOI 10.1111/j.1439-0450.1976.tb01619.x.
- BOCHAROVA, E. N., ZAVALISHINA, L. E., BRAGINA, E. E., KLIMOVA, R. R., GUSAK, Yu K., KURILO, L. F., SHILEIKO, L. V., PETROV, A. N., FRANK, G. A. et KUSHCH, A. A., 2007. Detection of herpes simplex virus genomic DNA in spermatozoa of patients with fertility disorders by in situ hybridization. *Doklady biological sciences: proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological sciences sections*. 2007. Vol. 412, pp. 82-86. DOI 10.1134/s0012496607010279.
- BOTTINELLI, M., RAMPACCI, E., STEFANETTI, V., MARENZONI, M.L., MALMLOV, A.M., COLETTI, M. et PASSAMONTI, F., 2016. Serological and biomolecular survey on canine herpesvirus-1 infection in a dog breeding kennel. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2016. Vol. 78, n° 5, pp. 797-802. DOI 10.1292/jvms.15-0543.
- BOURLET, T., LEVY, R., LAPORTE, S., BLACHIER, S, BOCKET, L., CASSUTO, G., CHOLLET, L., LERUEZ-VILLE, M., MAERTENS, A., MOUSNIER, F., PASQUIER, C., PAYAN, C., PELLEGRIN, B., SCHVOERER, E., ZAVADZKI, P., CHOUTEAU, J., DUVERLIE, G., IZOPET, J., LUNEL-FABIANI, F., PAWLITSKY, J.M., PROFIZI, N., ROUZIUX, C., STOLL-KELLER, F., THIBAUT, V., WATTRÉ, P. et POZZETTO, B., 2003. Multicenter Quality Control for the Detection of Hepatitis C Virus RNA in Seminal Plasma Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. février 2003. Vol. 41, n° 2, pp. 789-793. DOI 10.1128/JCM.41.2.789-793.2003.
- BURR, P. D., CAMPBELL, M. E. M., NICOLSON, L. et ONIONS, D. E., 1996. Detection of Canine Herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*. 1 décembre 1996. Vol. 53, n° 3, pp. 227-237. DOI 10.1016/S0378-1135(96)01227-8.
- BUSTIN, S.A., BENES, V., GARSON, J.A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M.W., SHIPLEY, G.L., VANDESOMPELE, J. et WITTEWER, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 1 avril 2009. Vol. 55, n° 4, pp. 611-622. DOI 10.1373/clinchem.2008.112797.
- CALCATERA, S.M., REICKS, D. et PRATT, S.L., 2018. Novel and differentially abundant microRNAs in sperm cells, seminal plasma, and serum of boars due to porcine reproduction and respiratory syndrome virus infection. *Animal Reproduction Science*. décembre 2018. Vol. 199, pp. 60-71. DOI 10.1016/j.anireprosci.2018.10.007.

CARMICHAEL, L. E., 1970. Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 15 juin 1970. Vol. 156, n° 12, pp. 1714-1721.

CARMICHAEL, L. E. et BARNES, Frances D., 1969. Effect of Temperature on Growth of Canine Herpesvims in Canine Kidney Cell and Macrophage Cultures. *The Journal of Infectious Diseases*. 1 décembre 1969. Vol. 120, n° 6, pp. 664-668. DOI 10.1093/infdis/120.6.664.

CARMICHAEL, L. E., SQUIRE, R. A. et KROOK, L., 1965. Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. *American Journal of Veterinary Research*. juillet 1965. Vol. 26, n° 113, pp. 803-814.

CARMICHAEL, L. E., STRANDBERG, John D. et BARNES, Frances D., 1965. Identification of a Cytopathogenic Agent Infectious for Puppies as a Canine Herpesvirus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1 décembre 1965. Vol. 120, n° 3, pp. 644-650. DOI 10.3181/00379727-120-30614.

CASSUTO, N.G., SIFER, C., FELDMANN, G., BOURET, D., MORET, F., BENIFLA, J.L., PORCHER, R., NAOURI, M., NEURAZ, A., ALVAREZ, S., PONCELET, C., MADELENAT, P. et DEVAUX, A., 2002. A modified RT-PCR technique to screen for viral RNA in the semen of hepatitis C virus-positive men. *Human Reproduction*. 1 décembre 2002. Vol. 17, n° 12, pp. 3153-3156. DOI 10.1093/humrep/17.12.3153.

CASTRO, M., DAVID, M., GONÇALVES, E.C., SIQUEIRA, A.S., VIRGULINO, R.R. et AGUIAR, D.C., 2021. First molecular detection of canine herpesvirus 1 (CaHV-1) in the Eastern Brazilian Amazon. *Journal of Veterinary Science* [en ligne]. 16 décembre 2021. Vol. 23, n° 2. [Consulté le 22 septembre 2023]. DOI 10.4142/jvs.21202. Disponible à l'adresse : <https://doi.org/10.4142/jvs.21202>

CHARLES, C., BENCHARIF, D., MARTIGNAT, L., LOPÈS, P. et COULAIS-DORSO, L., 2022. *Mise en évidence pour la première fois dans le sperme de chien de l'herpèsvirus canin (CHV) : contribution à l'étude du risque de transmission vénérienne par PCR temps réel et analyse complémentaire sérologique*. Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation.

CHASTANT-MAILLARD, S., 2015. Impact of Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) on Reproduction. *Transboundary and Emerging Diseases*. juin 2015. Vol. 62, n° 3, pp. 245-251. DOI 10.1111/tbed.12155.

CHEN, B., JIANG, Y., CAO, X., LIU, C., ZHANG, N. et SHI, D., 2021. Droplet digital PCR as an emerging tool in detecting pathogens nucleic acids in infectious diseases. *Clinica Chimica Acta*. 1 juin 2021. Vol. 517, pp. 156-161. DOI 10.1016/j.cca.2021.02.008.

CHEN, H., JIANG, Y., MRUK, D.D. et CHENG, C.Y., 2021. Spermiation: Insights from Studies on the Adjudin Model. In : CHENG, C.Yan et SUN, Fei (éd.), *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* [en ligne]. Cham : Springer International Publishing. pp. 241-254. [Consulté le 11 mai 2024]. ISBN 978-3-030-77779-1. Disponible à l'adresse : [https://doi.org/10.1007/978-3-030-77779-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-77779-1_12)

CHEN, R., ZHANG, W., GONG, M., WANG, F., WU, H., LIU, W., GAO, Y., LIU, B., CHEN, S., LU, W., YU, X., LIU, A., HAN, R., CHEN, Y. et HAN, D., 2021. Characterization of an Antiviral Component in

Human Seminal Plasma. *Frontiers in Immunology* [en ligne]. 19 février 2021. Vol. 12. [Consulté le 31 juillet 2024]. DOI 10.3389/fimmu.2021.580454. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.580454/full>

CHENG, C.Y. et MRUK, D.D., 2012. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews*. janvier 2012. Vol. 64, n° 1, pp. 16-64. DOI 10.1124/pr.110.002790.

CHŁOPIK, A. et WYSOKIŃSKA, A., 2020. Canine spermatozoa—What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in Domestic Animals*. 2020. Vol. 55, n° 2, pp. 113-126. DOI 10.1111/rda.13596.

COHEN, J.I., 2020. Herpesvirus latency. *The Journal of Clinical Investigation*. 1 juillet 2020. Vol. 130, n° 7, pp. 3361-3369. DOI 10.1172/JCI136225.

CORNWELL, J. C. et WRIGHT, N. G., 1969. Neonatal canine herpesvirus infection: a review of present knowledge. *The Veterinary Record*. 4 janvier 1969. Vol. 84, n° 1, pp. 2-6. DOI 10.1136/vr.84.1.2.

DA SILVA, N., ZARDOYA, R., SANTURDE, G., SOLANA, A. et CASTRO, J. M., 1995. Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhoea virus genome in semen. *Journal of Virological Methods*. octobre 1995. Vol. 55, n° 2, pp. 209-218. DOI 10.1016/0166-0934(95)00059-4.

DAVIDSON, W. R., APPEL, M. J., DOSTER, G. L., BAKER, O. E. et BROWN, J. F., 1992. Diseases and parasites of red foxes, gray foxes, and coyotes from commercial sources selling to fox-chasing enclosures. *Journal of Wildlife Diseases*. octobre 1992. Vol. 28, n° 4, pp. 581-589. DOI 10.7589/0090-3558-28.4.581.

DAVIES, R., MINHAS, S. et JAYASENA, C.N., 2023. Next-Generation Sequencing to Elucidate the Semen Microbiome in Male Reproductive Disorders. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*. 22 décembre 2023. Vol. 60, n° 1, pp. 25. DOI 10.3390/medicina60010025.

DAY, M. J., CAREY, S., CLERCX, C., KOHN, B., MARSILIO, F., THIRY, E., FREYBURGER, L., SCHULZ, B. et WALKER, D. J., 2020. Aetiology of Canine Infectious Respiratory Disease Complex and Prevalence of its Pathogens in Europe. *Journal of Comparative Pathology*. 1 avril 2020. Vol. 176, pp. 86-108. DOI 10.1016/j.jcpa.2020.02.005.

DE ALBUQUERQUE, B.H., DE OLIVEIRA, M.T., ADERALDO, J.F., DE MEDEIROS GARCIA TORRES, M. et LANZA, D.C., 2022. Human seminal virome: a panel based on recent literature. *Basic and Clinical Andrology*. 6 septembre 2022. Vol. 32, pp. 16. DOI 10.1186/s12610-022-00165-9.

DEBONO, E., HALFON, P., BOURLIERE, M., GEROLAMI-SANTANDREA, V., GASTALDI, M., CASTELLANI, P., CARTOUZOU, G., BOTTA-FRIDLUND, D., CAU, Pierre et GAUTHIER, André, 2000. Absence of hepatitis C genome in semen of infected men by polymerase chain reaction, branched DNA and in situ hybridization. *Liver*. 2000. Vol. 20, n° 3, pp. 257-261. DOI 10.1034/j.1600-0676.2000.020003257.x.

DECARO, N., MARTELLA, V. et BUONAVOGLIA, C., 2008. Canine Adenoviruses and Herpesvirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 1 juillet 2008. Vol. 38, n° 4, pp. 799-814. DOI 10.1016/j.cvsm.2008.02.006.

DIAS QUEIROZ-CASTRO, V.L., SANTOS, M.R., AUGUSTO DE AZEVEDO-JÚNIOR, M., PAULINO DA COSTA, E., PEREIRA ALVES, S.V., NASCIMENTO SILVA, L.M., DOHANIK, V.T. et SILVA-JÚNIOR, A., 2021. Bovine alphaherpesvirus 1 (BHV1) infection in testes and epididymis from bulls from a slaughterhouse. *Theriogenology*. 1 janvier 2021. Vol. 159, pp. 1-6. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.10.001.

DÍAZ, R., INOSTROZA, K., RISOPATRÓN, J., SANCHEZ, R. et SEPÚLVEDA, N., 2014. Identification of fatty acids in canine seminal plasma. *Andrologia*. mars 2014. Vol. 46, n° 2, pp. 194-197. DOI 10.1111/and.12070.

DIEUZY, I., VANNIER, P. et JESTIN, A., 1987. Effects of experimental pseudorabies virus infection on vaccinated pregnant sows. *Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research*. 1987. Vol. 18, n° 3, pp. 233-240. Scopus

DRECHSLER, Y., 2020. Canine Herpesvirus. In : *Clinical Small Animal Internal Medicine* [en ligne]. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 855-856. [Consulté le 25 septembre 2023]. ISBN 978-1-119-50123-7. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119501237.ch81>

EGGERT-KRUSE, W., REULAND, M., JOHANNSEN, W., STROWITZKI, T. et SCHLEHOFER, J.R., 2009. Cytomegalovirus (CMV) infection—related to male and/or female infertility factors? *Fertility and Sterility*. 1 janvier 2009. Vol. 91, n° 1, pp. 67-82. DOI 10.1016/j.fertnstert.2007.11.014.

EISA, M., LOUCIF, H., VAN GREVENYNGHE, J. et PEARSON, A., 2021. Entry of the Varicellovirus Canid herpesvirus 1 into Madin–Darby canine kidney epithelial cells is pH-independent and occurs via a macropinocytosis-like mechanism but without increase in fluid uptake. *Cellular Microbiology*. 2021. Vol. 23, n° 12, pp. e13398. DOI 10.1111/cmi.13398.

EISA, M., MICKY, S. et PEARSON, A., 2022. Canid herpesvirus 1 Preferentially Infects Polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells from the Basolateral Surface. *Viruses*. 14 juin 2022. Vol. 14, n° 6, pp. 1291. DOI 10.3390/v14061291.

ELAZHARY, M. A., LAMOTHE, P., SILIM, A. et ROY, R. S., 1980. Bovine herpesvirus type 1 in the sperm of a bull from a herd with fertility problems. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*. décembre 1980. Vol. 21, n° 12, pp. 336-339.

ENGLAND, G. C. W., ALLEN, W. E. et MIDDLETON, D. J., 1990. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Research in Veterinary Science*. 1 juillet 1990. Vol. 49, n° 1, pp. 66-70. DOI 10.1016/S0034-5288(18)31048-8.

ERLES, K, DUBOVI, E.J., BROOKS, H.W. et BROWNLIE, J., 2004. Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. octobre 2004. Vol. 42, n° 10, pp. 4524-4529. DOI 10.1128/jcm.42.10.4524-4529.2004.

ESTEVEZ, P. A., SPILKI, F. R., FRANCO, A. C., SILVA, T. C., OLIVEIRA, E. a. S., MOOJEN, V., ESMERALDINO, A. M. et ROEHE, P. M., 2003. Bovine herpesvirus type 5 in the semen of a bull not

exhibiting clinical signs. *The Veterinary Record*. 24 mai 2003. Vol. 152, n° 21, pp. 658-659. DOI 10.1136/vr.152.21.658.

EVERMANN, J. F., LEAMASTER, B. R., MCELWAIN, T. F., POTTER, K. A., MCKEIRNAN, A. J. et GREEN, J. S., 1984. Natural infection of captive coyote pups with a herpesvirus antigenically related to canine herpesvirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 décembre 1984. Vol. 185, n° 11, pp. 1288-1290.

EVERMANN, J.F., LEDBETTER, E.C. et MAES, R.K., 2011. Canine Reproductive, Respiratory, and Ocular Diseases due to Canine Herpesvirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 1 novembre 2011. Vol. 41, n° 6, pp. 1097-1120. DOI 10.1016/j.cvsm.2011.08.007.

FANG, Y., SU, Y., XU, J., HU, Z., ZHAO, K., LIU, C. et ZHANG, H., 2021. Varicocele-Mediated Male Infertility: From the Perspective of Testicular Immunity and Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 31 août 2021. Vol. 12, pp. 729539. DOI 10.3389/fimmu.2021.729539.

FAVIER, P.A., MARIN, M.S. et PÉREZ, S.E., 2012. Role of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) in diseases of cattle. Recent findings on BoHV-5 association with genital disease. *Open Veterinary Journal*. 2012. Vol. 2, n° 1, pp. 46-53.

FIJAK, M., BHUSHAN, S. et MEINHARDT, A., 2011. Immunoprivileged sites: the testis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2011. Vol. 677, pp. 459-470. DOI 10.1007/978-1-60761-869-0\_29.

FONTBONNE, A., 2011. L'herpès-virose canine. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 2011. Vol. 164, n° 4, pp. 331-340. DOI 10.4267/2042/48105.

FRESHMAN, J.L., 2002. Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 1 août 2002. Vol. 17, n° 3, pp. 104-107. DOI 10.1053/svms.2002.34326.

GELDARD, H., GEERING, W. A. et BAGUST, T. J., 1971. Isolation of a Herpesvirus from Neonatal Dogs in Australia. *Australian Veterinary Journal*. 1971. Vol. 47, n° 6, pp. 286-287. DOI 10.1111/j.1751-0813.1971.tb02162.x.

GERVAIS, K.J., PIRIE, C.G., LEDBETTER, E.C. et PIZZIRANI, S., 2012. Acute primary canine herpesvirus-1 dendritic ulcerative keratitis in an adult dog. *Veterinary Ophthalmology*. 2012. Vol. 15, n° 2, pp. 133-138. DOI 10.1111/j.1463-5224.2011.00952.x.

GIMENES, F., SOUZA, R.P., BENTO, J.C, TEIXEIRA, J.J.V., MARIA-ENGLER, S.S., BONINI, M.G. et CONSOLARO, M.E.L., 2014. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nature Reviews Urology*. décembre 2014. Vol. 11, n° 12, pp. 672-687. DOI 10.1038/nrurol.2014.285.

GODET, A. N., SOIGNON, G., KOUBI, H., BONNAFOUS, P., AGUT, H., POIROT, C. et GAUTHERET-DEJEAN, A., 2015. Presence of HHV-6 genome in spermatozoa in a context of couples with low fertility: what type of infection? *Andrologia*. juin 2015. Vol. 47, n° 5, pp. 531-535. DOI 10.1111/and.12299.

GOMES, L. I., ROCHA, M. A., SOUZA, J. G., COSTA, E. A. et BARBOSA-STANCIOLI, E. F., 2003. Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the US4 gene.

*Veterinary Research Communications*. septembre 2003. Vol. 27, n° 6, pp. 495-504. DOI 10.1023/a:1025745825610.

GOWTAGE-SEQUEIRA, S., 2004. *The importance of jackals and domestic dogs for the transmission of generalist canid pathogens to sympatric carnivores in Namibia* [en ligne]. The University of Edinburgh. [Consulté le 12 octobre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://era.ed.ac.uk/handle/1842/29786>

GREENE, C. E., 2012. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th Edition. In : . Saint Louis. pp. 48-54.

GUÉRIN, C, ALLIETTA, M, GUÉRIN, B et THIBIER, M, 1995. Utilisation de la technique d'amplification de gène pour la détection du virus de la maladie d'Aujeszky dans le sperme de verrat. *Veterinary Research*. 1995. Vol. 26, n° 2, pp. 140-144.

HAN, T.T., HUANG, J.H., LI, L.X., LIAO, X., MENG, Xiang-Qian, WEN, Z.N., SUN, Q., MA, J. et HUANG, T.H., 2024. Integration of hepatitis B virus into patients' sperm genome and its clinical risks. *Andrology*. 20 mars 2024. DOI 10.1111/andr.13618.

HASHIMOTO, A., HIRAI, K., OKADA, K. et FUJIMOTO, Y., 1979. Pathology of the placenta and newborn pups with suspected intrauterine infection of canine herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research*. septembre 1979. Vol. 40, n° 9, pp. 1236-1240.

HASHIMOTO, A., HIRAI, K., SUZUKI, Y. et FUJIMOTO, Y., 1983. Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. *American Journal of Veterinary Research*. avril 1983. Vol. 44, n° 4, pp. 610-614.

HASHIMOTO, A., HIRAI, K., YAMAGUCHI, T. et FUJIMOTO, Y., 1982. Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research*. mai 1982. Vol. 43, n° 5, pp. 844-850.

HAZELTON, P.R. et GELDERBLOM, H.R., 2003. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerging Infectious Diseases*. mars 2003. Vol. 9, n° 3, pp. 294-303. DOI 10.3201/eid0903.020327.

HEBIA-FELLAH, I., LÉAUTÉ, A., FIÉNI, F., ZIENTARA, S., IMBERT-MARCILLE, B.M., BESSE, B., FORTIER, G., PRONOST, S., MISZCZAK, F., FERRY, B., THORIN, C., PELLERIN, J.L. et BRUYAS, J.F., 2009. Evaluation of the presence of equine viral herpesvirus 1 (EHV-1) and equine viral herpesvirus 4 (EHV-4) DNA in stallion semen using polymerase chain reaction (PCR). *Theriogenology*. juin 2009. Vol. 71, n° 9, pp. 1381-1389. DOI 10.1016/j.theriogenology.2009.01.009.

HEDGER, M.P., 2015. The Immunophysiology of Male Reproduction. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 2015. pp. 805-892. DOI 10.1016/B978-0-12-397175-3.00019-3.

HILL, H. et MARÉ, C. J., 1974. Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research*. mai 1974. Vol. 35, n° 5, pp. 669-672.



- HOLZ, C.L., SLEDGE, D.G., KIUPEL, M., NELLI, R.K., GOEHRING, L.S. et SOBOLL HUSSEY, G., 2019. Histopathologic Findings Following Experimental Equine Herpesvirus 1 Infection of Horses. *Frontiers in Veterinary Science*. 4 mars 2019. Vol. 6, pp. 59. DOI 10.3389/fvets.2019.00059.
- HOSSAIN, M.S., TAREQ, K.m.a., HAMMANO, K.I. et TSUJII, H., 2007. Effect of fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction. *Reproductive Medicine and Biology*. 2007. Vol. 6, n° 4, pp. 235-239. DOI 10.1111/j.1447-0578.2007.00191.x.
- HOUEN, G. et TRIER, N.H., 2020. Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2020. Vol. 11, pp. 587380. DOI 10.3389/fimmu.2020.587380.
- HUXSOLL, D. L. et HEMELT, I. E., 1970. Clinical observations of canine herpesvirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 15 juin 1970. Vol. 156, n° 12, pp. 1706-1713.
- JAGER, M.C., SLOMA, E.A., SHELTON, M. et MILLER, A.D., 2017. Naturally Acquired Canine Herpesvirus-Associated Meningoencephalitis. *Veterinary Pathology* [en ligne]. 28 juin 2017. [Consulté le 26 octobre 2024]. DOI 10.1177/0300985817716263. Disponible à l'adresse : <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985817716263> Sage CA: Los Angeles, CA
- KASPERSEN, M.D. et HÖLLSBERG, P., 2013. Seminal shedding of human herpesviruses. *Virology Journal*. 8 juillet 2013. Vol. 10, pp. 226. DOI 10.1186/1743-422X-10-226.
- KASPERSEN, M.D., LARSEN, P.B., KOFOD-OLSEN, E., FEDDER, J., BONDE, J. et HÖLLSBERG, P., 2012. Human Herpesvirus-6A/B Binds to Spermatozoa Acrosome and Is the Most Prevalent Herpesvirus in Semen from Sperm Donors. *PLoS ONE*. 7 novembre 2012. Vol. 7, n° 11, pp. e48810. DOI 10.1371/journal.pone.0048810.
- KIMBER, K.R., KOLLIAS, G.V. et DUBOVI, E.J., 2000. SEROLOGIC SURVEY OF SELECTED VIRAL AGENTS IN RECENTLY CAPTURED WILD NORTH AMERICAN RIVER OTTERS (*LONTRA CANADENSIS*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. juin 2000. Vol. 31, n° 2, pp. 168-175. DOI 10.1638/1042-7260(2000)031[0168:SSOSVA]2.0.CO;2.
- KIRKLAND, P. D., POYNTING, A. J., GU, X. et DAVIS, R. J., 2009. Infertility and venereal disease in cattle inseminated with semen containing bovine herpesvirus type 5. *The Veterinary Record*. 25 juillet 2009. Vol. 165, n° 4, pp. 111-113. DOI 10.1136/vetrec.165.4.111.
- KROGENÆS, A., ROOTWELT, V., LARSEN, S., RENSTRÖM, L., FARSTAD, W. et LUND, A., 2014. A serological study of canine herpesvirus-1 infection in a population of breeding bitches in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2 avril 2014. Vol. 56, n° 1, pp. 19. DOI 10.1186/1751-0147-56-19.
- KROGENÆS, A., ROOTWELT, V., LARSEN, S., SJØBERG, E. K., AKSELSEN, B., SKÅR, T. M., MYHRE, S. S., RENSTRÖM, L. H. M., KLINGEBORN, B. et LUND, A., 2012. A serologic study of canine herpes virus-1 infection in the Norwegian adult dog population. *Theriogenology*. 1 juillet 2012. Vol. 78, n° 1, pp. 153-158. DOI 10.1016/j.theriogenology.2012.01.031.
- KUMAR, S., DRISKELL, E. A., COOLEY, A. J., JIA, K., BLACKMON, S., WAN, X.-F., UHL, E. W., SALIKI, J. T., SANCHEZ, S., KRIMER, P. M. et HOGAN, R. J., 2015. Fatal Canid Herpesvirus 1 Respiratory Infections in 4 Clinically Healthy Adult Dogs. *Veterinary Pathology*. 1 juillet 2015. Vol. 52, n° 4, pp. 681-687. DOI 10.1177/0300985814556190.

KUSTRITZ, MARGARET V. ROOT, 2006. 10 - Pregnancy. In : KUSTRITZ, MARGARET V. ROOT (éd.), *The Dog Breeder's Guide to Successful Breeding and Health Management* [en ligne]. Saint Louis : W.B. Saunders. pp. 147-165. [Consulté le 19 septembre 2023]. ISBN 978-1-4160-3139-0. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416031390500146>

LARA, E.G.V., ROMERO, B.L.B., MARÍN, L.C., SOLIS, J.I.A., GALLARDO, S.G., VERDE, C.C., CRESPO, J.A.M. et ANDA, G.V., 2016. Pathology Isolation and Identification of Canine Herpesvirus (CHV-1) in Mexico. *Open Journal of Pathology*. 29 juin 2016. Vol. 6, n° 3, pp. 111-121. DOI 10.4236/ojpathology.2016.63014.

LEDBETTER, E.C., DUBOVI, E.J., KIM, S.G., MAGGS, D.J. et BICALHO, R.C., 2009. Experimental primary ocular canine herpesvirus-1 infection in adult dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 1 avril 2009. Vol. 70, n° 4, pp. 513-521. DOI 10.2460/ajvr.70.4.513.

LEDBETTER, E.C., HORNBUCKLE, W.E. et DUBOVI, E.J., 2009. Virologic survey of dogs with naturally acquired idiopathic conjunctivitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 15 octobre 2009. Vol. 235, n° 8, pp. 954-959. DOI 10.2460/javma.235.8.954.

LEDBETTER, E.C., KIM, S.G., DUBOVI, E.J. et BICALHO, R.C., 2009. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Veterinary Microbiology*. 2 juillet 2009. Vol. 138, n° 1, pp. 98-105. DOI 10.1016/j.vetmic.2009.03.013.

LEDBETTER, E.C., NICKLIN, A.M., SPERTUS, C.B., PENNINGTON, M.R., WALLE, G.R. et MOHAMMED, H.O., 2018. Evaluation of topical ophthalmic ganciclovir gel for the treatment of dogs with experimentally induced ocular canine herpesvirus-1 infection. *American Journal of Veterinary Research*. 1 juillet 2018. Vol. 79, n° 7, pp. 762-769. DOI 10.2460/ajvr.79.7.762.

LEDBETTER, E.C., SILVA, E.C., KIM, S.G., DUBOVI, E.J. et SCHWARK, W.S., 2012. Frequency of spontaneous canine herpesvirus-1 reactivation and ocular viral shedding in latently infected dogs and canine herpesvirus-1 reactivation and ocular viral shedding induced by topical administration of cyclosporine and systemic administration of corticosteroids. *American Journal of Veterinary Research*. 1 juillet 2012. Vol. 73, n° 7, pp. 1079-1084. DOI 10.2460/ajvr.73.7.1079.

LEE, W.Y., LEE, R., PARK, H.J., DO, J.T., PARK, C., KIM, J.H., JHUN, H., LEE, J.H., HUR, T. et SONG, H., 2017. Characterization of male germ cell markers in canine testis. *Animal Reproduction Science*. 1 juillet 2017. Vol. 182, pp. 1-8. DOI 10.1016/j.anireprosci.2017.01.002.

LEMÉE, L., GUEUDIN, M. et PILLET, S., 2022. Principe et limites des nouveaux outils de biologie moléculaire dans le diagnostic microbiologique. *Revue Francophone des Laboratoires*. 1 avril 2022. Vol. 2022, n° 541, pp. 28-42. DOI 10.1016/S1773-035X(22)00134-4.

LEWIN, A.C., COGHILL, L.M., MIRONOVICH, M., LIU, C.C., CARTER, R.T. et LEDBETTER, E.C., 2020. Phylogenomic Analysis of Global Isolates of Canid Alphaherpesvirus 1. *Viruses*. décembre 2020. Vol. 12, n° 12, pp. 1421. DOI 10.3390/v12121421.

LIPPOLD, S., BRAUN, B., KRÜGER, F., HARMS, M., MÜLLER, J.A., GROSS, R., MÜNCH, J. et VON EINEM, J., 2019. Natural Inhibitor of Human Cytomegalovirus in Human Seminal Plasma. *Journal of Virology*. 15 mars 2019. Vol. 93, n° 6, pp. e01855-18. DOI 10.1128/JVI.01855-18.

- LIU, Y.X., 2010. Temperature control of spermatogenesis and prospect of male contraception. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*. 1 janvier 2010. Vol. 2, n° 2, pp. 730-755. DOI 10.2741/s97.
- LOSURDO, M., DOWGIER, G., LUCENTE, M.S., CINONE, M., CAMERO, M., COLAIANNI, M.L., PASSANTINO, G., VENTRIGLIA, G., BUONAVOGLIA, D. et DECARO, N., 2018. Long-term shedding of Canine alphaherpesvirus 1 in naturally infected newborn pups. *Research in Veterinary Science*. 1 août 2018. Vol. 119, pp. 244-246. DOI 10.1016/j.rvsc.2018.07.001.
- LYRIO, L.L, LAZARO, M.A., SONEGHETI, R., MOULIN, L., COSLOP, L., SARTO, C.G., LOUREIRO, B. et FAVORETO, M.G., 2023. Effects of heat stress on sperm quality of French Bulldogs. *Theriogenology*. 15 mars 2023. Vol. 199, pp. 131-137. DOI 10.1016/j.theriogenology.2023.01.023.
- MADSEN, K.S., 2005. Management of disease control and epidemics in AI in Denmark. *Theriogenology*. 15 janvier 2005. Vol. 63, n° 2, pp. 585-594. DOI 10.1016/j.theriogenology.2004.09.032.
- MARCELAIN, G., CHEVAILLER, A., FOURNEL, S., GUBLER, B., LELIÈVRE, J.D., SEILLÈS, E. et VITTE, J., 2018. *Immunologie fondamentale et immunopathologie*. 2ème édition. Elsevier. Les cours de L2-L3 Médecine.
- MARTELLINI, J.A., COLE, A.L., VENKATARAMAN, N., QUINN, G.A., SVOBODA, P., GANGRADE, B.K., POHL, J., SØRENSEN, O.E. et COLE, A.M., 2009. Cationic polypeptides contribute to the anti-HIV-1 activity of human seminal plasma. *The FASEB Journal*. octobre 2009. Vol. 23, n° 10, pp. 3609-3618. DOI 10.1096/fj.09-131961.
- MATSUU, A., YABUKI, M., AOKI, E. et IWAHANA, M., 2020. Molecular detection of canine respiratory pathogens between 2017 and 2018 in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 16 juin 2020. Vol. 82, n° 6, pp. 690-694. DOI 10.1292/jvms.20-0017.
- MAURIÈRE, M., BENCHARIF, D. et MEURENS, F., 2019. *Détection de l'Herpèsvirus canin par PCR quantitative dans l'éjaculat et les testicules chez le chien*. Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation, Nantes Atlantique.
- MEDVECZKY, I. et SZABÓ, I., 1981. Isolation of Aujeszky's disease virus from boar semen. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*. 1981. Vol. 29, n° 1, pp. 29-35.
- METCALF, E. S., 2001. The role of international transport of equine semen on disease transmission. *Animal Reproduction Science*. 3 décembre 2001. Vol. 68, n° 3-4, pp. 229-237. DOI 10.1016/s0378-4320(01)00159-2.
- MILLERET, C., BENCHARIF, D., MARTIGNAT, L., LOPÈS, P. et RENOIS, F., 2022. *Cultures primaires de cellules de Sertoli de chien : validation d'une méthode préparatoire en vue d'étudier une possible infection par l'herpèsvirus canin (CHV-1)*. Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation.
- MIYOSHI, M., ISHII, Y., TAKIGUCHI, M., TAKADA, A., YASUDA, J., HASHIMOTO, A., OKAZAKI, K. et KIDA, H., 1999. Detection of Canine Herpesvirus DNA in the Ganglionic Neurons and the Lymph Node Lymphocytes of Latently Infected Dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1999. Vol. 61, n° 4, pp. 375-379. DOI 10.1292/jvms.61.375.

MONTEIRO, F.L., CARGNELUTTI, J.F., MARTINS, M., ANZILIERO, D., ERHARDT, M.M., WEIBLEN, R. et FLORES, E.F., 2016. Detection of respiratory viruses in shelter dogs maintained under varying environmental conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*. 1 octobre 2016. Vol. 47, n° 4, pp. 876-881. DOI 10.1016/j.bjm.2016.07.002.

MOORE, D. E., ASHLEY, R. L., ZARUTSKIE, P. W., COOMBS, R. W., SOULES, M. R. et COREY, L., 1989. Transmission of genital herpes by donor insemination. *JAMA*. 16 juin 1989. Vol. 261, n° 23, pp. 3441-3443.

MORÁN, P. E., FAVIER, P. A., LOMÓNACO, M., CATENA, M. C., CHIAPPARRONE, M. L., ODEÓN, A. C., VERNA, A. E. et PÉREZ, S. E., 2013. Search for the genome of bovine herpesvirus types 1, 4 and 5 in bovine semen. *Open Veterinary Journal*. 15 novembre 2013. Vol. 3, n° 2, pp. 126-130.

MORE, G. D., CAVE, N. J., BIGGS, P. J., ACKE, E. et DUNOWSKA, M., 2021. A molecular survey of canine respiratory viruses in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*. juillet 2021. Vol. 69, n° 4, pp. 224-233. DOI 10.1080/00480169.2021.1915211.

MOSSADEGH-KELLER, N., GENTEK, R., GIMENEZ, G., BIGOT, S., MAILFERT, S. et SIEWEKE, M.H., 2017. Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations. *Journal of Experimental Medicine*. 7 août 2017. Vol. 214, n° 10, pp. 2829-2841. DOI 10.1084/jem.20170829.

MRUK, D.D. et CHENG, C.Y., 2015. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocrine Reviews*. octobre 2015. Vol. 36, n° 5, pp. 564-591. DOI 10.1210/er.2014-1101.

MÜLLER, J.A., HARMS, M., KRÜGER, F., GROSS, R., JOAS, S., HAYN, M., DIETZ, A.N., LIPPOLD, S., VON EINEM, J., SCHUBERT, A., MICHEL, M., MAYER, B., CORTESE, M., JANG, K.S., SANDI-MONROY, N., DENIZ, M., EBNER, F., VAPALAHTI, O., OTTO, M., BARTENSCHLAGER, R., HERBEUVAL, J.P., SCHMIDT-CHANASIT, J., ROAN, N.R. et MÜNCH, J., 2018. Semen inhibits Zika virus infection of cells and tissues from the anogenital region. *Nature Communications*. 7 juin 2018. Vol. 9, pp. 2207. DOI 10.1038/s41467-018-04442-y.

MÜNCH, J., RÜCKER, E., STÄNDKER, L., ADERMANN, K., GOFFINET, C., SCHINDLER, M., WILDUM, S., CHINNADURAI, R., RAJAN, D., SPECHT, A., GIMÉNEZ-GALLEGO, G., SÁNCHEZ, P.C., FOWLER, D.M., KOULOV, A., KELLY, J.W., MOTHES, W., GRIVEL, J.C., MARGOLIS, L., KEPPLER, O.T., FORSSMANN, W.G. et KIRCHHOFF, F., 2007. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell*. 14 décembre 2007. Vol. 131, n° 6, pp. 1059-1071. DOI 10.1016/j.cell.2007.10.014.

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE, 2024. Microarray Technology. *National Human Genome Research Institute* [en ligne]. 16 septembre 2024. [Consulté le 16 septembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Microarray-Technology>

NAUMENKO, V.A., TYULENEV, Y.A., YAKOVENKO, S.A., KURILO, L.F., SHILEYKO, L.V., SEGAL, A.S., ZAVALISHINA, L.E., KLIMOVA, R.R., TSIBIZOV, A.S., ALKHOVSKII, S.V. et KUSHCH, A.A., 2011. Detection of human cytomegalovirus in motile spermatozoa and spermatogenic cells in testis organotypic culture. *Herpesviridae*. 28 juin 2011. Vol. 2, pp. 7. DOI 10.1186/2042-4280-2-7.

- NEOFYTOU, E., SOURVINOS, G., ASMARIANAKI, M., SPANDIDOS, D.A. et MAKRIGIANNAKIS, A., 2009. Prevalence of human herpes virus types 1–7 in the semen of men attending an infertility clinic and correlation with semen parameters. *Fertility and Sterility*. 1 juin 2009. Vol. 91, n° 6, pp. 2487-2494. DOI 10.1016/j.fertnstert.2008.03.074.
- NOLAN, T., HANDS, R.E., OGUNKOLADE, W. et BUSTIN, S.A., 2006. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Analytical Biochemistry*. 15 avril 2006. Vol. 351, n° 2, pp. 308-310. DOI 10.1016/j.ab.2006.01.051.
- NÖTHLING, J. O., HÜSSY, D., STECKLER, D. et ACKERMANN, M., 2008. Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa. *Theriogenology*. 1 février 2008. Vol. 69, n° 3, pp. 276-282. DOI 10.1016/j.theriogenology.2007.09.022.
- NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N. et HASE, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 15 juin 2000. Vol. 28, n° 12, pp. e63.
- O'DONNELL, L., 2015. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis*. 26 janvier 2015. Vol. 4, n° 2, pp. e979623. DOI 10.4161/21565562.2014.979623.
- O'SHAUGHNESSY, P.J., 2014. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 1 mai 2014. Vol. 29, pp. 55-65. DOI 10.1016/j.semcd.2014.02.010.
- OUATTARA, L.A., ANDERSON, S.M. et DONCEL, G.F., 2018. Seminal exosomes and HIV-1 transmission. *Andrologia*. décembre 2018. Vol. 50, n° 11, pp. e13220. DOI 10.1111/and.13220.
- PAL, N., HUANG, Y. W., MADSON, D. M., KUSTER, C., MENG, X. J., HALBUR, P. G. et OPRIESSNIG, T., 2008. Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of porcine circovirus type 2 and an internal control on porcine semen samples. *Journal of Virological Methods*. 1 mai 2008. Vol. 149, n° 2, pp. 217-225. DOI 10.1016/j.jviromet.2008.02.002.
- PALLIER, C., TEBOURBI, L., CHOPINEAU-PROUST, S., SCHOEVAERT, D., NORDMANN, P., TESTART, J. et COURTOT, A.M., 2002. Herpesvirus, cytomegalovirus, human sperm and assisted fertilization. *Human Reproduction*. 1 mai 2002. Vol. 17, n° 5, pp. 1281-1287. DOI 10.1093/humrep/17.5.1281.
- PAPAGEORGIOU, K.V., SUÁREZ, N.M., WILKIE, G.S., MCDONALD, M., GRAHAM, E.M. et DAVISON, A.J., 2016. Genome Sequence of Canine Herpesvirus. *PLOS ONE*. 23 mai 2016. Vol. 11, n° 5, pp. e0156015. DOI 10.1371/journal.pone.0156015.
- PARZEFALL, B., FISCHER, A., BLUTKE, A., SCHMAHL, W. et MATIASEK, K., 2011. Naturally-occurring canine herpesvirus-1 infection of the vestibular labyrinth and ganglion of dogs. *The Veterinary Journal*. 1 juillet 2011. Vol. 189, n° 1, pp. 100-102. DOI 10.1016/j.tvjl.2010.06.014.
- PASQUIER, C., SOUYRIS, C., MOINARD, N., BUJAN, L. et IZOPET, J., 2006. Validation of an automated real-time PCR protocol for detection and quantitation of HIV and HCV genomes in

semen. *Journal of Virological Methods*. 1 octobre 2006. Vol. 137, n° 1, pp. 156-159. DOI 10.1016/j.jviromet.2006.05.023.

PAWAR, S.S., MESHARAM, C.D., SINGH, N.K., SONWANE, A.A., SAINI, M., RAUTMARE, S.S., MUGLIKAR, D.M., MISHRA, B. P. et GUPTA, P.K., 2014. Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Archives of Virology*. avril 2014. Vol. 159, n° 4, pp. 641-648. DOI 10.1007/s00705-013-1869-2.

PAYNE, S., 2023. 4 - Methods to study viruses. In : PAYNE, Susan (éd.), *Viruses (Second Edition)* [en ligne]. Academic Press. pp. 39-58. [Consulté le 5 août 2024]. ISBN 978-0-323-90385-1. Disponible à l'adresse : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323903851000224>

POMERANZ, L.E., REYNOLDS, A.E. et HENGARTNER, C.J., 2005. Molecular Biology of Pseudorabies Virus: Impact on Neurovirology and Veterinary Medicine. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. septembre 2005. Vol. 69, n° 3, pp. 462-500. DOI 10.1128/MMBR.69.3.462-500.2005.

POSTE, G. et KING, N., 1971. Isolation of a herpesvirus from the canine genital tract: association with infertility, abortion and stillbirths. *The Veterinary Record*. 27 février 1971. Vol. 88, n° 9, pp. 229-233. DOI 10.1136/vr.88.9.229.

POULET, H., 2005. Actualités et questions sur l'herpès-virose canine. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 2005. Vol. 158, n° 4, pp. 353-361. DOI 10.4267/2042/47789.

RADU, O. et PANTANOWITZ, L., 2013. Kaposi Sarcoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 1 février 2013. Vol. 137, n° 2, pp. 289-294. DOI 10.5858/arpa.2012-0101-RS.

RANA, S.K., SAMAYAM, R., RAJAN, S. et SRINIVASAN, V.A., 2011. Use of real-time polymerase chain reaction to detect bovine herpesvirus 1 in frozen cattle and buffalo semen in India. *Vet Ital*. 2011. Vol. 47.

RÉSEAU D'ÉPIDÉMIO-SURVEILLANCE EN PATHOLOGIE ÉQUINE, 2024. Herpès-virose équine de type 1 (HVE1). *Respe - Réseau d'Epidémio-Surveillance en Pathologie Équine* [en ligne]. 2024. [Consulté le 26 juillet 2024]. Disponible à l'adresse : <https://respe.net/maladie-equine/avortement/herpes-virus-equin-1/>

REYES-SOTELO, B., MOTA-ROJAS, D., MARTINEZ-BURNES, J., OLMOS-HERNANDEZ, A., HERNÁNDEZ AVALOS, I., JOSÉ PÉREZ, N., CASAS ALVARADO, A., GÓMEZ-PRADO, J. et MORA-MEDINA, P., 2021. Thermal homeostasis in the newborn puppy: Behavioral and physiological responses. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*. 1 janvier 2021. Vol. 9, pp. 1-25. DOI 10.31893/jabb.21012.

REZAEI, M., JAJARMI, M., ALIZADEH, R., KHALILI, M. et BABAEI, H., 2020. First molecular study of Canine herpesvirus-1 in reproductive specimens of adult dogs in southeast of Iran. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 1 août 2020. Vol. 71, pp. 101487. DOI 10.1016/j.cimid.2020.101487.

REZAEI, M., JAJARMI, M., KAMANI, S., KHALILI, M. et BABAEI, H., 2023. Prevalence of canine herpesvirus 1 and associated risk factors among bitches in Iranian breeding kennels and farms. *Veterinary Medicine and Science*. 17 septembre 2023. DOI 10.1002/vms3.1246.

- ROAN, N.R., MÜLLER, J.A., LIU, H., CHU, S., ARNOLD, F., STÜRZEL, C.M., WALTHER, P., DONG, M., WITKOWSKA, H.E., KIRCHHOFF, F., MÜNCH, J. et GREENE, W.C., 2011. Peptides Released by Physiological Cleavage of Semen Coagulum Proteins Form Amyloids that Enhance HIV Infection. *Cell Host & Microbe*. 15 décembre 2011. Vol. 10, n° 6, pp. 541-550. DOI 10.1016/j.chom.2011.10.010.
- ROBINSON, A. J., CRERAR, S. K., WAIGHT SHARMA, N., MÜLLER, W. J. et BRADLEY, M. P., 2005. Prevalence of serum antibodies to canine adenovirus and canine herpesvirus in the European red fox (*Vulpes vulpes*) in Australia. *Australian Veterinary Journal*. juin 2005. Vol. 83, n° 6, pp. 356-361. DOI 10.1111/j.1751-0813.2005.tb15634.x.
- ROCHA, M. A., BARBOSA, E. F., GUIMARÃES, S. E., DIAS NETO, E. et GOUVEIA, A. M., 1998. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Veterinary Microbiology*. 28 août 1998. Vol. 63, n° 1, pp. 1-11. DOI 10.1016/s0378-1135(98)00213-2.
- RONSSSE, V., VERSTEGEN, J., ONCLIN, K., FARNIR, F. et POULET, H., 2004. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology*. 1 février 2004. Vol. 61, n° 4, pp. 619-636. DOI 10.1016/S0093-691X(03)00249-8.
- RONSSSE, V, VERSTEGEN, J, ONCLIN, K, GUIOT, AI, AEBERLÉ, C, NAUWYNCK, HJ et POULET, H, 2002. Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 in the Belgian Dog Population in 2000. *Reproduction in Domestic Animals*. 2002. Vol. 37, n° 5, pp. 299-304. DOI 10.1046/j.1439-0531.2002.00363.x.
- SARKER, S, DAS, S, HELBIG, K, PETERS, A et RAIDAL, Sr, 2018. Genome sequence of an Australian strain of canid alphaherpesvirus 1. *Australian Veterinary Journal*. 2018. Vol. 96, n° 1-2, pp. 24-27. DOI 10.1111/avj.12659.
- SCHÄFER-SOMI, S. et PALME, N., 2016. Seminal Plasma Characteristics and Expression of ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) in Canine Spermatozoa from Ejaculates with Good and Bad Freezability. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. avril 2016. Vol. 51, n° 2, pp. 232-239. DOI 10.1111/rda.12671.
- SEMPRINI, A. E., LEVI-SETTI, P., BOZZO, M., RAVIZZA, M., TAGLIORETTI, A., SULPIZIO, P., ALBANI, E., ONETA, M. et PARDI, G., 1992. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet (London, England)*. 28 novembre 1992. Vol. 340, n° 8831, pp. 1317-1319. DOI 10.1016/0140-6736(92)92495-2.
- SEMPRINI, A.E., MACALUSO, M., HOLLANDER, L., VUCETICH, A., DUERR, A., MOR, G., RAVIZZA, M. et JAMIESON, D.J., 2013. Safe conception for HIV-discordant couples: insemination with processed semen from the HIV-infected partner. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1 mai 2013. Vol. 208, n° 5, pp. 402.e1-402.e9. DOI 10.1016/j.ajog.2013.02.009.
- SEMPRINI, A.E., PERSICO, T., THIERS, V., ONETA, M., TUVERI, R., SERAFINI, P., BOSCHINI, A., GIUNTELLI, S., PARDI, G. et BRECHOT, C., 1998. Absence of Hepatitis C Virus and Detection of Hepatitis G Virus/GB Virus C RNA Sequences in the Semen of Infected Men. *The Journal of Infectious Diseases*. 1 avril 1998. Vol. 177, n° 4, pp. 848-854. DOI 10.1086/515257.
- SEO, I., SEONG, W. et LIM, C., 1994. Survey on the seroepidemiology of canine herpesvirus infection in Korea. *Korean Journal of Veterinary Research*. 1994. Vol. 34, n° 3, pp. 647-652.

- SHANG, Y., DONG, X., HAN, G., LI, J., CUI, D., LIU, C., LI, L. et YI, S., 2015. The Roles of Tight Junctions and Claudin-1 in the Microbubble-Mediated Ultrasound-Induced Enhancement of Drug Concentrations in Rat Prostate. *The Journal of Membrane Biology*. décembre 2015. Vol. 248, n° 6, pp. 1167-1173. DOI 10.1007/s00232-015-9834-5.
- SILVA, J.A.F., CALMASINI, F., SIQUEIRA-BERTI, A., MORAES-VIEIRA, P.M.M, QUINTAR, A. et CARVALHO, H.F., 2020. Prostate immunology: A challenging puzzle. *Journal of Reproductive Immunology*. 1 novembre 2020. Vol. 142, pp. 103190. DOI 10.1016/j.jri.2020.103190.
- SOARES, J.M., AVELAR, G.F. et FRANÇA, L.R., 2009. The seminiferous epithelium cycle and its duration in different breeds of dog (*Canis familiaris*). *Journal of Anatomy*. octobre 2009. Vol. 215, n° 4, pp. 462-471. DOI 10.1111/j.1469-7580.2009.01122.x.
- SPERBER, H.S., SUTTER, K., MÜLLER, K., MÜLLER, P. et SCHWARZER, R., 2022. The Bovine Seminal Plasma Protein PDC-109 Possesses Pan-Antiviral Activity. *Viruses*. 13 septembre 2022. Vol. 14, n° 9, pp. 2031. DOI 10.3390/v14092031.
- SPERTUS, C.B., MOHAMMED, H.O. et LEDBETTER, E.C., 2016. Effects of topical ocular application of 1% trifluridine ophthalmic solution in dogs with experimentally induced recurrent ocular canine herpesvirus-1 infection. *American Journal of Veterinary Research*. 1 octobre 2016. Vol. 77, n° 10, pp. 1140-1147. DOI 10.2460/ajvr.77.10.1140.
- SPERTZEL, R. O., HUXSOLL, D. L., MCCONNELL, S. J., BINN, L. N. et YAGER, R. H., 1965. Recovery and Characterization of a Herpes-like Virus from Dog Kidney Cell Cultures. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1 décembre 1965. Vol. 120, n° 3, pp. 651-655. DOI 10.3181/00379727-120-30615.
- STEWART, S. E., DAVID-FERREIRA, J., LOVELACE, E., LANDON, J. et STOCK, N., 1965. HERPES-LIKE VIRUS ISOLATED FROM NEONATAL AND FETAL DOGS. *Science (New York, N.Y.)*. 4 juin 1965. Vol. 148, n° 3675, pp. 1341-1343. DOI 10.1126/science.148.3675.1341.
- STRAHAN, R., UPPAL, T. et VERMA, S.C., 2016. Next-Generation Sequencing in the Understanding of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) Biology. *Viruses*. 31 mars 2016. Vol. 8, n° 4, pp. 92. DOI 10.3390/v8040092.
- STRANDBERG, J D et CARMICHAEL, L E, 1965. Electron microscopy of a canine herpesvirus. *Journal of Bacteriology*. décembre 1965. Vol. 90, n° 6, pp. 1790-1792. DOI 10.1128/jb.90.6.1790-1792.1965.
- STRÖM HOLST, B., HAGBERG GUSTAVSSON, M., GRAPPERON-MATHIS, M., LILLIEHÖÖK, I., JOHANNISSON, A., ISAKSSON, M., LINDHE, A. et AXNÉR, E., 2012. Canine herpesvirus during pregnancy and non-pregnant luteal phase. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. décembre 2012. Vol. 47 Suppl 6, pp. 362-365. DOI 10.1111/rda.12099.
- STRZEZEK, R., KOZIOROWSKA-GILUN, M., KOWALÓWKA, M. et STRZEZEK, J., 2009. Characteristics of antioxidant system in dog semen. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2009. Vol. 12, n° 1, pp. 55-60. Scopus



- TANG, Q., ROAN, N.R. et YAMAMURA, Y., 2013. Seminal Plasma and Semen Amyloids Enhance Cytomegalovirus Infection in Cell Culture. *Journal of Virology*. décembre 2013. Vol. 87, n° 23, pp. 12583-12591. DOI 10.1128/JVI.02083-13.
- TANGHE, S., VANROOSE, G., VAN SOOM, A., DUCHATEAU, L., YSEBAERT, M. T., KERKHOFS, P., THIRY, E., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., VAN OOSTVELDT, P. et NAUWYNCK, H., 2005. Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. *Reproduction (Cambridge, England)*. août 2005. Vol. 130, n° 2, pp. 251-259. DOI 10.1530/rep.1.00636.
- TAVAKOLIAN, S., GOUDARZI, H., NAZARIAN, H., RAEE, P., NIAKAN, S. et FAGHIHLOO, E., 2021. The evaluation of Human papilloma virus and human herpes viruses (EBV, CMV, VZV HSV-1 and HSV-2) in semen samples. *Andrologia*. 2021. Vol. 53, n° 6, pp. e14051. DOI 10.1111/and.14051.
- TAYLOR, S.C., LAPERRIERE, G. et GERMAIN, H., 2017. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Scientific Reports* [en ligne]. 2017. Vol. 7. [Consulté le 16 novembre 2023]. DOI 10.1038/s41598-017-02217-x. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5445070/>
- TEANKUM, K., POSPISCHIL, A., JANETT, F., BÜRGI, E., BRUGNERA, E., HOELZLE, K., POLKINGHORNE, A., WEILENMANN, R., ZIMMERMANN, D. R. et BOREL, N., 2006. Detection of chlamydiae in boar semen and genital tracts. *Veterinary Microbiology*. 25 août 2006. Vol. 116, n° 1, pp. 149-157. DOI 10.1016/j.vetmic.2006.03.021.
- TEARLE, J. P., SMITH, K. C., BOYLE, M. S., BINNS, M. M., LIVESAY, G. J. et MUMFORD, J. A., 1996. Replication of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the testes and epididymides of ponies and venereal shedding of infectious virus. *Journal of Comparative Pathology*. novembre 1996. Vol. 115, n° 4, pp. 385-397. DOI 10.1016/s0021-9975(96)80073-9.
- THOMAS, R., MACSWEEN, K.F., MCAULAY, K., CLUTTERBUCK, D., ANDERSON, R., REID, S., HIGGINS, C.D., SWERDLOW, A.J., HARRISON, N., WILLIAMS, Hilary et CRAWFORD, D.H., 2006. Evidence of shared Epstein-Barr viral isolates between sexual partners, and low level EBV in genital secretions. *Journal of Medical Virology*. septembre 2006. Vol. 78, n° 9, pp. 1204-1209. DOI 10.1002/jmv.20682.
- THOMPSON, H., WRIGHT, N. G. et CORNWELL, H. J. C., 1972. Canine Herpesvirus Respiratory Infection. *Research in Veterinary Science*. 1 mars 1972. Vol. 13, n° 2, pp. 123-128. DOI 10.1016/S0034-5288(18)34056-6.
- TORRES, L., ORTIZ, T. et TANG, Q., 2015. Enhancement of Herpes Simplex Virus (HSV) Infection by Seminal Plasma and Semen Amyloids Implicates a New Target for the Prevention of HSV Infection. *Viruses*. 20 avril 2015. Vol. 7, n° 4, pp. 2057-2073. DOI 10.3390/v7042057.
- TRUYEN, U., MÜLLER, T., HEIDRICH, R., TACKMANN, K. et CARMICHAEL, L. E., 1998. Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiology and Infection*. octobre 1998. Vol. 121, n° 2, pp. 433-440. DOI 10.1017/s0950268898001319.

VAN ENGELENBURG, F A, MAES, R K, VAN OIRSCHOT, J T et RIJSEWIJK, F A, 1993. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *Journal of Clinical Microbiology*. décembre 1993. Vol. 31, n° 12, pp. 3129-3135.

VANNIER, P. et GUEGUEN, B., 1979. Excrétion du virus de la maladie d'Aujeszky par les voies génitales mâles du porc. Persistance du virus dans la semence de verrat. *Journées rech. porcine en France*. 1979. pp. 401-406.

VAN OIRSCHOT, J. T., 1995. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *The Veterinary Quarterly*. mars 1995. Vol. 17, n° 1, pp. 29-33. DOI 10.1080/01652176.1995.9694526.

VAN RIJN, P.A., WELLENBERG, G.J., HAKZE-VAN DER HONING, R., JACOBS, L., MOONEN, P.L.J.M. et FEITSMA, H., 2004. Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative RealTime PCR<sup>TM</sup> technology. *Journal of Virological Methods*. 15 septembre 2004. Vol. 120, n° 2, pp. 151-160. DOI 10.1016/j.jviromet.2004.04.014.

VIEIRA, N.M.G., LOSANO, J.D.A., ANGRIMANI, D.S.R., KAWAI, G.K.V., BICUDO, L.C., RUI, B.R., DA SILVA, B.C.S., ASSUMPÇÃO, M.E.O. et NICHI, M., 2018. Induced sperm oxidative stress in dogs: Susceptibility against different reactive oxygen species and protective role of seminal plasma. *Theriogenology*. 1 mars 2018. Vol. 108, pp. 39-45. DOI 10.1016/j.theriogenology.2017.11.020.

VOEVODIN, A. et MARX, P., 2009. Principles of Virology. In : *Simian Virology* [en ligne]. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 39-59. [Consulté le 6 septembre 2024]. ISBN 978-0-8138-0979-3. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780813809793.ch2>

WALD, A., MATSON, P., RYNCARZ, A. et COREY, L., 1999. Detection of Herpes Simplex Virus DNA in Semen of Men With Genital HSV-2 Infection. *Sexually Transmitted Diseases*. janvier 1999. Vol. 26, n° 1, pp. 1.

WALLACH, E.E., KANDEEL, F.R. et SWERDLOFF, R.S., 1988. Role of temperature in regulation of spermatogenesis and the use of heating as a method for contraception. *Fertility and Sterility*. 1 janvier 1988. Vol. 49, n° 1, pp. 1-23. DOI 10.1016/S0015-0282(16)59640-X.

WALTER, J., BALZER, H.-J., SEEH, C., FEY, K., BLEUL, U. et OSTERRIEDER, N., 2012. Venereal shedding of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in naturally infected stallions. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2012. Vol. 26, n° 6, pp. 1500-1504. DOI 10.1111/j.1939-1676.2012.00997.x.

WANG, F., SHAO, X., BAO, B., YANG, Y., WANG, Y., ZHANG, J., WANG, S., CHEN, Y. et HAN, D., 2024. Cytotoxic and viricidal effects of human semen on mumps virus-infected lymphocytes: In vitro studies. *Journal of Medical Virology*. juin 2024. Vol. 96, n° 6, pp. e29733. DOI 10.1002/jmv.29733.

WANG, J., O'KEEFE, J., ORR, D., LOTH, L., BANKS, M., WAKELEY, P., WEST, D., CARD, R., IBATA, G., VAN MAANEN, K., THOREN, P., ISAKSSON, M. et KERKHOF, P., 2007. Validation of a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen. *Journal of Virological Methods*. 1 septembre 2007. Vol. 144, n° 1, pp. 103-108. DOI 10.1016/j.jviromet.2007.04.002.

WANG, J., O'KEEFE, J., ORR, D., LOTH, L., BANKS, M., WAKELEY, P., WEST, D., CARD, R., IBATA, G., VAN MAANEN, K., THOREN, P., ISAKSSON, M. et KERKHOF, P., 2008. An international inter-

laboratory ring trial to evaluate a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in extended bovine semen. *Veterinary Microbiology*. 1 janvier 2008. Vol. 126, n° 1-3, pp. 11-19. DOI 10.1016/j.vetmic.2007.06.005.

WANG, L.C., KUO, Y.T., CHUEH, L.L., HUANG, D. et LIN, J.H., 2017. The detection and differentiation of canine respiratory pathogens using oligonucleotide microarrays. *Journal of Virological Methods*. mai 2017. Vol. 243, pp. 131-137. DOI 10.1016/j.jviromet.2017.02.004.

WANG, R., GORNALUSSE, G.G., KIM, Y., PANDEY, U., HLADIK, F. et VOJTECH, L., 2020. Potent Restriction of Sexual Zika Virus Infection by the Lipid Fraction of Extracellular Vesicles in Semen. *Frontiers in Microbiology*. 29 septembre 2020. Vol. 11, pp. 574054. DOI 10.3389/fmicb.2020.574054.

WATTS, D.E. et BENSON, A.M., 2016. PREVALENCE OF ANTIBODIES FOR SELECTED CANINE PATHOGENS AMONG WOLVES (CANIS LUPUS) FROM THE ALASKA PENINSULA, USA. *Journal of Wildlife Diseases*. 1 juillet 2016. Vol. 52, n° 3, pp. 506-515. DOI 10.7589/2015-06-140.

WEISS, L.M. et CHEN, Y.Y., 2013. EBER in situ hybridization for Epstein-Barr virus. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2013. Vol. 999, pp. 223-230. DOI 10.1007/978-1-62703-357-2\_16.

WELKE, R.W., HARALAMPIEV, I., SCHRÖTER, F., BRAUN, B.C., HERRMANN, A., SIEBEN, C. et MÜLLER, P., 2019. Inhibition of influenza virus activity by the bovine seminal plasma protein PDC-109. *European Biophysics Journal*. 1 septembre 2019. Vol. 48, n° 6, pp. 503-511. DOI 10.1007/s00249-019-01374-3.

WHEAT, W., CHOW, L., KUZMIK, A., SOONTARARAK, S., KURIHARA, J., LAPPIN, M. et DOW, S., 2019. Local immune and microbiological responses to mucosal administration of a Liposome-TLR agonist immunotherapeutic in dogs. *BMC Veterinary Research*. 13 septembre 2019. Vol. 15, n° 1, pp. 330. DOI 10.1186/s12917-019-2073-8.

WONG, E.W.P., MRUK, D.D. et CHENG, C.Y., 2008. Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. *Biochimica et biophysica acta*. mars 2008. Vol. 1778, n° 3, pp. 692-708. DOI 10.1016/j.bbamem.2007.11.006.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2014. Chapter 2.2.3. – Development and optimisation of nucleic acid detection assays. In : *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* [en ligne]. 13th. [Consulté le 22 septembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2017. Infectious Bovine Rhinotracheitis / Infectious Pustular Vulvovaginitis. In : *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, thirteenth edition 2024* [en ligne]. 13th. [Consulté le 9 septembre 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2021. Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases. In : *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, thirteenth edition 2024* [en ligne]. 13th. [Consulté le 9 septembre 2024]. Disponible à l'adresse :

<https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>

WRIGHT, N. G., CORNWELL, H. J., THOMPSON, H. et STEWART, M., 1970. Canine herpesvirus respiratory infection. *The Veterinary Record*. 25 juillet 1970. Vol. 87, n° 4, pp. 108-109. DOI 10.1136/vr.87.4.108.

XUAN, X., HORIMOTO, T., LIMCUMPAO, J. A., TOHYA, Y., TAKAHASHI, E. et MIKAMI, T., 1992. Glycoprotein-specific immune response in canine herpesvirus infection. *Archives of Virology*. 1 septembre 1992. Vol. 122, n° 3, pp. 359-365. DOI 10.1007/BF01317197.

XUAN, X., HORIMOTO, T., ONO, M., LIMCUMPAO, J.A., TOHYA, Y., AZETAKA, M., TAKAHASHI, E. et MIKAMI, T., 1990. Restriction Endonuclease Analysis of Canine Herpesviruses Isolated in Japan. *The Japanese Journal of Veterinary Science*. 1990. Vol. 52, n° 6, pp. 1181-1188. DOI 10.1292/jvms1939.52.1181.

XUAN, X., KOJIMA, A., MURATA, T., MIKAMI, T. et OTSUKA, H., 1997. Analysis of canine herpesvirus gB, gC and gD expressed by a recombinant vaccinia virus. *Archives of Virology*. 1 mai 1997. Vol. 142, n° 5, pp. 1003-1010. DOI 10.1007/s007050050135.

YEŞİLBAĞ, K., YALÇIN, E., TUNCER, P. et YILMAZ, Z., 2012. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. *Research in Veterinary Science*. 1 février 2012. Vol. 92, n° 1, pp. 36-39. DOI 10.1016/j.rvsc.2010.10.016.

YU, Z., ZHAO, Z., CHEN, L., YAN, H., CUI, Q., JU, X., YONG, Y., LIU, X., MA, X. et ZHANG, G., 2022. Development of a droplet digital PCR assay to detect bovine alphaherpesvirus 1 in bovine semen. *BMC Veterinary Research*. 2 avril 2022. Vol. 18, pp. 125. DOI 10.1186/s12917-022-03235-2.

ZAFER, M., HORVATH, H., MMEJE, O., POEL, S., SEMPRINI, A., RUTHERFORD, G. et BROWN, J., 2015. Effectiveness of semen washing to prevent HIV transmission and assist pregnancy in HIV-discordant couples: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility*. 11 décembre 2015. Vol. 105, n° 3, pp. 645. DOI 10.1016/j.fertnstert.2015.11.028.

# ANNEXES

## ANNEXE 1 : MO-6 - CULTURE CELLULAIRE : LIGNEE MDCK

<b>MO-6 - Culture cellulaire : lignée canine MDCK</b>		
Rédaction	Vérification	Approbation
<i>Geoffroy Jouenne puis Mehdi Chiguer</i>	<i>Mehdi Chiguer &amp; Angelina Lazennec</i>	<i>Lionel Marnigat</i>
27/06/2022 V2 le 24/11/22	24/05/2023	25/05/2023

### **Objectif :**

Cultiver des cellules adhérentes MDCK dans le but de les expandre.

### **Consommables, matériel :**

- DMEM, SVF décomplémenté, Pénicilline-streptomycine (10 000 UI/mL), PBS, Trypsine 10X, bleu Trypan, DMSO, Isopropanol
- Bain-marie 37°C, centrifugeuse, PSM II, flasque de la marque Corning ou Nunc avec bouchon filtrant, seringue, filtre 0,22 µm

### **Mode opératoire**

**La lignée MDCK est conservée en DMSO + SVF dans des tubes de 2 mL - Canister en azote liquide repro.**

- Préparer de milieu « complet » : DMEM high glucose with stable glutamine et sodium pyruvate + SVF à 10% + Péni/Strepto à 100 UI / ml (1/100). 500 ml : -55ml en F50ml ; + 5 ml P/S + 50 ml SVF décomplémenté
- Optionnel : filtrer ce milieu complet avec une seringue et un filtre 0,22 µm.
- Récupérer l'ampoule en N2 -
- Décongeler rapidement et partiellement l'ampoule congelée environ 30 secondes au bain-marie à 37°.
- Désinfecter l'extérieur de l'ampoule.
- Ajouter sous hotte sur le culot partiellement décongelé, 1 ml de milieu DMEM. QQ AR à la P1000 et transférer le contenu de l'ampoule dans 8 mL de milieu complet dans un tube Falcon 15 ml.
- Centrifuger 5 min à 150 g (300 g possible) à TA.

### **Numération :**

- Eliminer le sumageant, décoller les cellules du culot (choquer le tube), puis reprendre ce culot dans 10 mL de milieu complet (bien homogénéiser avec la pipette en aspirant/refoulant).
- Solution de travail de bleu Trypan : dilution de la solution mère au 1/5- soit 1 mL de bleu Trypan dans 4 mL de PBS, dans un tube de 5 mL (solution à réutiliser en la conservant à 4°C).
- Dans une plaque 96 puits, déposer 80 µL de bleu Trypan. Bien remettre en suspension les cellules qui ont tendance à faire des paquets. Ajouter 20 µL de suspension cellulaire sur les 80 µL de bleu Trypan soit une dilution au 1/5. Homogénéiser et remplir la cellule de Malassez qui a un volume de 1 µL et comporte 10 lignes / 10 carreaux. Compter environ 2-3 lignes entières, en dissociant le nombre de cellules vivantes n (sans couleur) et mortes v (colorées en bleu). En déduire le nombre moyen de cellules vivantes/ligne.

**Nombre de cellules vivantes / mL = n (de 1 ligne) x 10 x 5 (dilution) x 1000 (/ mL). Nb de cellules X 10**

### **Remise en culture (Maximum 45 passages par lignée)**

En fonction du nombre de cellules / mL trouvées, ensemercer les flasques suivant le tableau ci-après.

## ANNEXE 2 : MO-10 - AMPLIFICATION CHV SUR LIGNEE CANINE MDCK

MO-10 - Amplification CHV sur lignée canine MDCK		
Rédaction	Vérification	Approbation
Mehdi Chiguer et Lionel Marnignat	Mehdi Chiguer	Lionel Marnignat
21/12/2022	09/12/2022	05/04/2023

### Objectif

Amplification du virus CHV sur cellules MDCK - Infecter des cellules à 80 % de confluence (PAS 100 % !), le jour du dépôt de l'inoculum - Durée **4 à 7 jours**.

### Consommables, Réactifs, matériel

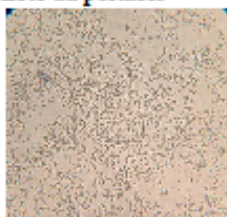
DMEM, SVF décomplémenté, Pénicilline-streptomycine (10 000 UI/mL), PBS, Trypsine 10X, bleu Trypan. PSM II, Incubateur « Contaminé », Agitateur (incubateur), Centrifugeuse réfrigérante, PipetAid, Pipette P1000 ; Flasques, Eppendorf 1,5 mL. GLACE.

### Mode opératoire

#### ✓ Lancement amplification

- Disposer d'une ou deux F75 (moyenne) à 60-80 % de confluence – (possible en grandes flasques DK13).

Prendre une photo au portable Ici 60% d'ECP



- Avant l'inoculation, éliminer le milieu de culture par aspiration ; laver 2 fois avec du **PBS à TA**.
- Déposer 4 ml de milieu DMEM complet.

Le calcul repose ensuite sur la TCID50 de l'inoculum déterminée en amont (cf MO-9)

- Préparer l'inoculum, sur la glace, pour avoir une MOI de 0.05 (5 virus pour 100 Cellules), pour avoir un titre de  $10^6$  non purifié) - Ajuster le volume à 1 ml pour une F75.

#### Exemple :

Pour amplifier le CHV sur un flasque P75 avec une MOI de 0.05

A partir d'un virus TCID50 =  $10^6$  pfu =  $10^6 \times 0.7 = 700\ 000$

Quantité de virus à utiliser = NB cellules par Flasque x MOI  
=  $7\ 500\ 000 \times 0.05 = 375\ 000$

Ayant un inoculum à  $10^6$ , il faudra Quantité de virus / pfu =  $375\ 000 / 700\ 000$   
= 0.54 ml de virus à  $10^6$

Volume de l'inoculum + volume de virus pour une F75 = 5 ml

Il faudra donc ajouter  $5 - 0.54 = 4.46$  ml de MEM + PS 1% dans la flasque.

- Déposer l'inoculum dans la flasque aux gouttes à gouttes sur le tapis cellulaire
- Incuber pendant 1 h 30 min, à **34°C** 5% CO2 avec agitation sur balancette (ou en agitant toutes les 15 min).
- Remplir la fiche de « Suivi des Amplifications » (Fichier même nom, dossier BILAN STOCKS).
- Ajouter **10 ml (/25 ml grande F)** de milieu DMEM complet sans éliminer l'inoculum (**PAS DE LAVAGE**). **15 ml (/30 ml grande F) / P75**, disponibles.
- Incuber à **34°C**, 5% CO2.

## ANNEXE 3 : MO-15 - TEST D'UN POSSIBLE EFFET « VIRUCIDE »

MO-15 – Test d'un possible effet « Virucide » du CHV		
Rédaction	Vérification	Approbation
24/11/2023	27/11/23 AM	27/11/23 PM
Julia Mangin	L Martignat & T Marconnet	L Martignat & Julia Mangin

**Objectif :** Mettre en contact le CHV (SNG AMPLI MDCK/DK13) et du liquide spermatique acellulaire (LSA), sur tapis de MDCK, pour mettre en évidence un potentiel effet virucide.

**Consommables, matériel :**

- DMEM complet (DMEMc), PBS
- Centrifugeuse à 4°C, PSM, étuve à 34°C

**Echantillons :**

- 4 F25 de cellules MDCK à confluence 90% (PSM IECM).
- Témoin négatif : surnageant de cellules MDCK non infectées
- Témoins positifs et tests : surnageant viral (SNG Ampli MDCK/DK13)
- Phases poolées, spermatique et prostatique chien X. *NB : si effet virucide penser ensuite à analyser chaque phase.*

**Mode opératoire (culture repro. / transfert des flasques d'IECM ; manipuler stérilement)**

**1) Préparation du liquide spermatique acellulaire du chien X**

- Décongélation et mélange (si besoin) des phases spermatiques et prostatiques.
- Centrifugation à 4000 g pendant 10 min à 4°C. **Récupération du surnageant = LSA.**

**2) Préparation des dilutions de virus DK13 : utilisation du SNG AMPLI/DK13**

Stocker 4°C

- D10 = Dilution au 1/10<sup>ème</sup> : 23 µL de SNG AMPLI/DK13 + 207 µL de DMEMc
- D50 = Dilution au 1/50<sup>ème</sup> : 22 µL de D10 + 88 µL de DMEMc

**3) Préparation des solutions d'incubations :**

1. F1 1 ml de SNG MDCK – (témoin -)
2. F2 100 µL de D10 + 900 µL de DMEMc (témoin +)
3. F3 100 µL de D10 + 900 µL de LSA (testD10) **Manip Vir4 = 600 µL LSA**
4. F4 100 µL de D50 + 900 µL de LSA (testD50) **+ 300 µL DMEMc**

→ Incubation pendant **3 h 30** à 34°C. Agitation toutes les ½ heures.

**4) Incubation sur les tapis cellulaires MDCK (vérifier cellules MDCK & numéroter les flasques)**

- Dans chaque flasque F1 à F4, ajouter 1ml des solutions d'incubation précédentes (point 3). Incubation pendant **1 h 30 à 34°C.**
- A l'issue, récupérer et centrifuger le surnageant (SNG0) ; aliquoter en Eppendorfs 1,5 ml et mettre à -80°C.
- Réaliser 2 **lavages** au PBS pour chaque tapis cellulaire. Ajouter **10 ml** de DMEMc dans chaque flasque
- Incuber à 34°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Surveiller l'infection **2X par JOUR** entre 24 et 48 h ! **Manip Vir4 = 24 h**

**5) Surveillance et arrêt incubation (toujours stérilement)**

- Mettre la centrifugeuse à +4°C et allumer le PSM. **Travailler sur glace.**
- Arrêt pour toutes les flasques simultanément ; si possible à 100 % de confluence pour le T- (F1), et signes d'infection non ambigus pour le T+ (F2) ; AVANT « infection totale ».

Toutes centrifugations pendant **10 min à 1000 g** à 4°C

- **Récupérer le SNG (SNG1)** en tube 13 ml conique – **Centrifuger** (garder ces « culots 1 » pour le tapis « gratté ») – A la P1000 récupérer 2 X 0,5 ml de SNG acellulaires, aliquotés en 2 Eppendorfs (1,5). Congeler à -20°C (Culture repro.), puis -80°C (RDC).
- Eliminer le SNG restant en tube 13 ml par retournement et assécher au KimWipes. Choquer les tubes et laisser les culots sur glace.
- Réaliser 2 lavages en PBS du tapis cellulaire ; Rajouter à nouveau 4 ml de PBS.
- **Gratter le tapis cellulaire**, du fond de la flasque au bouchon (avec un rateau stérile). Bords en premier puis milieu de la flasque. Récupérer la totalité et l'ajouter sur le culot 1 ; centrifuger. Eliminer le SNG. Choquer les tubes. Reprendre les culots dans 1 ml de PBS – Transfert en Eppendorf 1,5 ml annotés – Centrifuger – Assécher le culot par retournement et KimWipes. Congeler à -20°C (Culture repro.), puis -80°C (RDC).

*En fonction de premiers résultats envisager idem avec trypsination des cellules*

## ANNEXE 4 : MO-15 - TEST D'UN POSSIBLE EFFET « VIRUCIDE » AVEC TRYSPINE

<b>MO-JM-15 – Manip Virucide- Trypsine– CHV Chien</b>		
Rédaction	Vérification	Approbation
24/11/2023	27/11/23 AM	27/11/23 PM
Julia Mangin	L Martignat & T Marconnet	L Martignat & Julia Mangin

**Objectif :** Mettre en contact le CHV (SNG AMPLI MDCK/DK13) et du liquide spermatique acellulaire (LSA), sur tapis de MDCK, pour mettre en évidence un potentiel effet virucide.

**Consommables, matériel :**

- DMEM complet (DMEMc), PBS
- Centrifugeuse à 4°C, PSM, étuve à 34°C

**Echantillons :**

- 4 F25 de cellules MDCK à confluence 90% (PSM IECM).
- Témoin négatif : surnageant de cellules MDCK non infectées
- Témoins positifs et tests : surnageant viral (SNG Ampli MDCK/DK13)
- Phases poolées, spermatique et prostatique chien X. *NB : si effet virucide penser ensuite à analyser chaque phase.*

**Mode opératoire (culture repro. / transfert des flasques d'IECM ; manipuler stérilement)**

### 1) Préparation du liquide spermatique acellulaire du chien X

- Décongélation et mélange (si besoin) des phases spermatiques et prostatiques.
- Centrifugation à 4000 g pendant 10 min à 4°C. Récupération du surnageant = LSA.

### 2) Préparation des dilutions de virus DK13 : utilisation du SNG AMPLI/DK13

Stocker 4°C

- D10 = Dilution au 1/10ème : 23 µL de SNG AMPLI/DK13 + 207 µL de DMEMc
- D50 = Dilution au 1/50ème : 22 µL de D10 + 88 µL de DMEMc

### 3) Préparation des solutions d'incubations :

- |       |                               |  |
|-------|-------------------------------|--|
| 1. F1 | 1 ml de SNG MDCK – (témoin -) |  |
| 2. F2 | 100 µL de D10                 | + 900 µL de DMEMc (témoin +)                             |
| 3. F3 | 100 µL de D10                 | + 900 µL de LSA (testD10) <b>Manip ViR4 = 600 µL LSA</b> |
| 4. F4 | 100 µL de D50                 | + 900 µL de LSA (testD50) <b>+ 300 µL DMEMc</b>          |

→ Incubation pendant **3 h 30** à 34°C. Agitation toutes les ½ heures.

### 4) Incubation sur les tapis cellulaires MDCK (vérifier cellules MDCK & numéroter les flasques)

- Dans chaque flasque F1 à F4, ajouter 1ml des solutions d'incubation précédentes (point 3). Incubation pendant **1 h 30** à **34°C**.
- A l'issue, récupérer et centrifuger le surnageant (SNG0) ; aliquoter en Eppendorfs 1,5 ml et mettre à -80°C.
- Réaliser **2 lavages** au PBS pour chaque tapis cellulaire. Ajouter **10 ml** de DMEMc dans chaque flasque
- Incuber à 34°C, 5% de CO2. Surveiller l'infection **2X par JOUR** entre 24 et 48 h ! **Manip ViR4 = 24 h**

### 5) Surveillance et arrêt incubation (toujours stérilement)

- Mettre la centrifugeuse à +4°C et allumer le PSM. Travailler sur glace.
  - Arrêt pour toutes les flasques simultanément ; si possible à 100 % de confluence pour le T- (F1), et signes d'infection non ambigus pour le T+ (F2) ; AVANT « infection totale ».
- Toutes centrifugations pendant **10 min à 1000 g à 4°C**
- Récupérer le SNG (SNG1) en tube 13 ml conique – Centrifuger (garder ces « culots 1 » pour le tapis « gratté ») – A la P1000 récupérer 2 X 0,5 ml de SNG acellulaires, aliquotés en 2 Eppendorfs (1,5). Congeler à -20°C (Culture repro.), puis -80°C (RDC).
  - Eliminer le SNG restant en tube 13 ml par retournement et assécher au KimWipes. Choquer les tubes et laisser les culots sur glace.
  - Réaliser 1 lavage en PBS du tapis cellulaire ;
  - Ajouter 2 ml de trypsine à 4X pendant 10 minutes (vérifier décollement à 5 min)
  - Annuler l'action de la trypsine en ajoutant à la flasque 5 ml de DMEMc. Mettre le contenu de la flasque dans un tube Facon de 13 ml. Centrifuger, jeter le surnageant.
  - Réaliser un dernier lavage du culot avec 2 ml de PBS. Centrifuger. Aliquoter le SNG (SNG 2) Congeler à -20°C (Culture repro.), puis -80°C (RDC).
  - Choquer les tubes. Reprendre les culots dans 1 ml de PBS – Transfert en Eppendorf 1,5 ml annotés – Centrifuger – Assécher le culot par retournement et KimWipes. Congeler à -20°C (Culture repro.), puis -80°C (RDC).



## ANNEXE 5 : MO-15 - TEST D'INFECTION DES SPERMATOZOÏDES

<b>MO JM-16 – Test infection SPZ– CHV Chien</b>		
Rédaction	Vérification	Approbation
15/04/2024	16/04/24	
Julia Mangin	Lionel Martignat	

**Objectif :** Mettre en contact le CHV et des spermatozoïdes, puis après lavage mettre les spermatozoïdes en nacelles sur tapis cellulaire MDCK afin de mettre en évidence une potentielle infection avec les spz comme vecteurs viraux

**Consommables, matériel :**

- DMEMc, PBS, milieu de conservation « CaniPlus Chill LT » [ref : 13700/0045]
- Centrifugeuse à température ambiante puis à 4°C, PSM, étuve à 34°C
- Bain Marie à 37°C

**Echantillons :**

- Plaque 12 puits (P12) [ref : VWR – 734-0066] avec tapis cellulaire de cellules MDCK à confluence
- Surnageant viral : SNG A4 F2
- Phase spermatique de sperme frais de 2 chiens

**Mode opératoire :**

**1) Infection des spermatozoïdes :**

**- Mettre le bain marie à chauffer à 37°C**

- Prélèvement de sperme frais et séparation des trois phases (urétrale, spermatique, prostatique)
- Mettre 2 tubes de 2 ml de milieu de conservation Chill LT au bain marie
- Dilution de la phase spermatique au 1/3 dans le milieu de conservation Chill LT (1 ml de phase spermatique dans 2 ml de milieu)
- Mesure mobilité et progressif [appareil : Hamilton Thorn IVOS, cellule de comptage, 4 chambres, 20 µ chamber depth]
- Homogénéiser. Séparation du mélange en 2 tubes de volume équivalent (« SPZ - » et « SPZ + »)
- Numération des spz
- Ajout de 200 µl de SNG A4 F2 dans les tubes « SPZ + »
- Ajout de 200 µL de DMEMc dans les tubes « SPZ - »
- Incubation pendant 3 h 30 à 34°C
- Mesure mobilité et progressif
- Centrifuger les tubes à 400 g, 5 min, à température ambiante. Aliquoter et stocker les surnageants « SNG post-incub = SNGO » au -80°C.

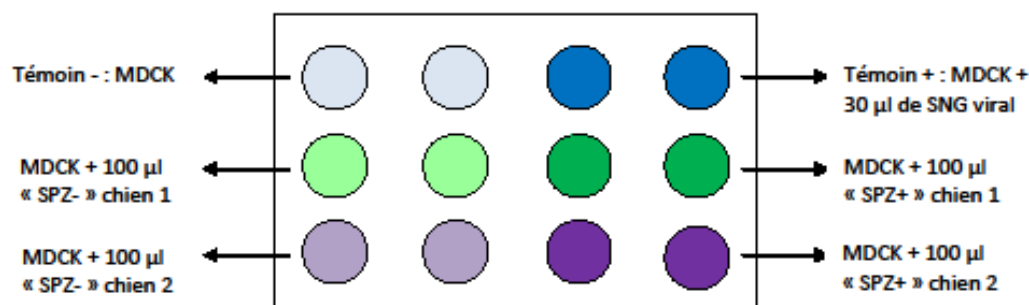
**2) Double lavage des culots (nombres de lavages susceptibles de varier)**

- Reprendre les culots dans 4 ml de milieu de conservation Chill LT.
- Centrifuger à 400 g, 5 min, à TA. Aliquoter et stocker les surnageants « SNG lavage 1 = SNG 1 ».
- Procéder de même une seconde fois (nommé « SNG lavage 2 = SNG 2 »)

**3) Infection de la plaque 12 puits (préalablementensemencée avec des cellules MDCK 0.4 millions/puits)**

- Retirer le milieu de la plaque 12 puits

- Ajouter 800 µl de DMEMc
- Mise en place de nacelles sur les puits SPZ
- Reprendre les culots dans 410 µl de DMEMc (car 4 puits par échantillon)
- Ajouter 100 µl de « SPZ- » et « SPZ+ » par nacelle et 30 µl de SNG viral selon la répartition suivante :



- QSP 1 mL (sans déborder) dans les puits avec nacelles (dépose hors de la nacelle), pour que la nacelle soit au contact du milieu
- Incuber la P12 à 34°C, 5% de CO2 et surveiller les signes d'infection.

#### 4) Retrait des nacelles

- Mettre la centrifugeuse à +4°C et allumer le PSM. Travailler sur glace
- à T0+24h retrait des nacelles, ou avant si signes d'infection francs ?
- Gratter le fond de la nacelle et la rincer avec 200µL de PBS. Récupérer le contenu des nacelles dans des aliquots.
- Centrifuger à 400 G, 5 min. Récupérer le surnageant « SNG nacelle 1 = SNG N1»
- Reprendre le culot dans 200 µl de PBS. Centrifuger à 400 G, 5 min. Récupérer le surnageant « SNG nacelle 2 = SNG N2 »
- Assécher le culot par retournement et Kim Wipes, (« SPZ N+/N-»).
- Maintenir la P12 en incubation à 34°C, 5% CO2 et surveillance infection.

#### 5) Arrêt incubation

- Mettre la centrifugeuse à +4°C et allumer le PSM. Travailler sur glace
- Arrêt incubation à T0 + 48h ou avant si signes d'infection francs ?
- Récupérer le surnageant en tube 2 ml. Centrifuger à 1000 G, 10 min. Aliquoter le surnageant « SNG3 MDCK - /MDCK +/MDCK-SPZ -/MDCK-SPZ + ». Garder les culots (culot 1) pour le tapis « gratté ».
- Eliminer le SNG restant par retournement et assécher au Kim Wipes. Choquer les tubes et laisser les culots sur glace.
- Réaliser 2 lavage au PBS du tapis cellulaire. Rajouter 800µl de PBS. Garder les SNG « SNG4&5 MDCK - /MDCK+/MDCK-SPZ -/MDCK-SPZ + »
- Gratter le tapis cellulaire, récupérer le contenu de chaque puits sur le culot 1.
- Centrifuger à 1000 G, 10 min puis récupérer et stocker à -80°C le SNG « SNG6 MDCK -/MDCK+/MDCK-SPZ - /MDCK-SPZ + »
- Assécher le culot par retournement et KimWipes et stocker à -80°C. « culots MDCK -/MDCK+/MDCK-SPZ - /MDCK-SPZ + »

## ANNEXE 6 : MO-2 – EXTRACTION D'ADN TOTAL A PARTIR DE CULOTS DE CELLULES MDCK

<b>MO-2 - Extraction d'ADN TOTAL à partir de culots de cellules de Chien (MDCK)</b>		
Rédaction	Vérification	Approbation
Anais Le Coz	MARTIGNAT Lionel	MARTIGNAT Lionel
03/12/2021	03/12/2021	03/12/2021

### **Objectif :**

Obtenir de l'ADN génomique de Chien et éventuellement de CHV latent (ou en multiplication)

### **Consommables, matériel :**

- Kit « Genomic DNA NucleoSpin Tissue » Macherey-Nagel Référence : 740 952.50 (50 extractions)
- 1 bain-marie à 70°C                      Resolubiliser ProtéinaseK et aliquoter par 150 µL en Eppendorf 0,5 ml
- 1 centrifugeuse 11 000g                      Ethanol absolu (48 ml) pour reconstituer B5

### **Mode opératoire**

A réaliser dans la « pièce d'extraction IECM » :

- Déposer 200 µL de tampon de lyse T1 sur culot cellulaire (frais ou décongelé > ou = à 1,5ml)
- Mélanger au vortex vigoureusement 20 secondes
- Ajouter 25 µL de protéinase K et 200 µL de tampon B3
- Mélanger au Vortex vif, 20 secondes. Centrifuger si besoin - Incuber 5 min à TA
- Lysér et digérer au bain-marie 10 min à 70°C
- Centrifuger brièvement, puis ajouter 210 µL d'Ethanol absolu
- Mélanger au Vortex vigoureusement 20 secondes
- Transférer tout le liquide sur colonne (max. 700 µL), placée sur un tube collecteur.
- Ne pas toucher la membrane de silice avec le cône de la pipette
- Centrifuger 1 min à 11 000 g. Jeter le tube collecteur et déposer la colonne sur un tube collecteur propre
- Lavage 1 : ajouter sur la colonne 500 µL de tampon BW. Centrifuger 1 min à 11000 g
- Jeter le tube collecteur et remettre la colonne sur un tube collecteur propre
- Lavage 2 : ajouter 600 µL de tampon B5. Centrifuger 1 min à 11 000 g.  
Jeter le tube collecteur et placer la colonne sur un tube collecteur propre
- Centrifuger de nouveau, 1 min à 11 000 g pour éliminer totalement l'éthanol. Vérifier que la colonne **est bien sèche**
- Placer la colonne sur un **tube « Eppendorf » 1,5 ml, annoté sur bouchon** et déposer 100 µL de tampon BE.
- Elution : Incuber 1 min à température ambiante (améliore le rendement) - Centrifuger 1 minute à 11000 g  
Jeter la colonne Bien fermer l'Eppendorf 1,5 ml.

NB Dosage au Nanodrop (PFBM) : sacrifier 2 microlitres avant 4°C ou -20°C (conservation long terme)  
Attention aux risques de contaminations (contact cônes, aérosols ...)  
Attention aux compatibilités cônes / pipettes – Rdt environ 100-200 ng/µl

## ANNEXE 7 : MO-5 – EXTRACTION D'ADN VIRAL A PARTIR DE LIQUIDE BIOLOGIQUE

<b>MO-5 - Extraction d'ADN VIRAL (CHV) à partir de liquide biologique (sperme de chien)</b>		
Rédaction	Vérification	Approbation
<i>Chloé Charles &amp; Mehdi Chiguer</i>	<i>Mehdi Chiguer et Lionel Martignat</i>	<i>MARTIGNAT Lionel</i>
24-06-2022 – 29-11-22	01-12-22	02-12-22

### **Objectif**

Obtenir de l'ADN de CHV dans la phase liquidienne du sperme de chien ou dans un SNG de culture cellulaire infectée – Kit Macherey-Nagel « DNA/RNA Nucleospin Virus », réf. 740983-50. [Instruction-NucleoSpin-Virus.pdf \(mn-net.com\)](#)

### **Avant de commencer la réaction :**

- Vérifier que le tampon VW2 est préparé comme indiqué
- Vérifier que le « Carrier RNA » est dissout dans l'eau EPPI
- Préparer un bain-marie à 70°C

### **Mode opératoire (pièce d'extraction IECM)**

Déposer 5 µL de protéinase K (celle du kit MN 740952 « classique » possible) dans un tube collecteur de 1,5 mL

- Ajouter 200 µL de liquide spermatique → cf **procédure « liquide séminal »**.  
Vortexer modérément 10 s
  - Ajouter 200 µL de tampon de lyse VL. Vortexer modérément 10 s Centrifuger si besoin à 2000 g, 10 s
  - Ajouter 5,6 µL de solution d'ARN Carrier. Vortexer modérément 5 s  
Incuber 3 min à température ambiante Centrifuger à 2000 g, 1s si besoin
  - Ajouter 200 µL d'éthanol. Vortexer 10 s  
Incuber 5 min à température ambiante Centrifuger brièvement à 2000 g, 1s
  - **Charger la totalité du mix préparé (environ 610 µL) sur une colonne NucleoSpin Virus (anneau rouge)**
    - Centrifuger à 4000 g, 3 min
  - 1- lavage : placer la colonne sur un nouveau tube collecteur et jeter le précédent  
Ajouter 400 µL de Tampon VW1 sur la colonne Centrifuger à 11 000 g, 30 s
  - 2- lavage : placer la colonne sur un nouveau tube collecteur et jeter le précédent  
Ajouter 400 µL de Tampon VW2 sur la colonne Centrifuger à 11 000 g, 30 s
  - 3- lavage : placer la colonne sur un nouveau tube collecteur et jeter le précédent  
Ajouter 200 µL de Tampon VW2 sur la colonne Centrifuger à 20 000 g, 5 min
  - Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur et jeter le précédent
    - Incuber tube ouvert 5 min à 56°C
  - Ajouter 30 µL d'eau « sans RNase » (**préchauffée à 70°C**), sur la colonne
    - Incuber 3 min à température ambiante
    - Centrifuger à 20 000 g, 3 min
- Récupérer le contenu du tube collecteur. Nanodrop pour évaluation de la qualité.
- Nb : dosage assurément faussé par le « Carrier RNA ».

## ANNEXE 8 : MO-8 – PROCEDURE Q-PCR EVAGREEN DE CHEZ SOLISBIODYNE

### 1) Salle mix

- Mettre blouse, gants, désinfecter la paillasse et les pipettes avec du RnaseAway.
- Sortir du congélateur ( tiroir 1, -20°C) les amorces (solution de travail) et le tampon (Evagreen 5x Hotfire pol mix + no Rox réf 08.25.00001) - les laisser à température ambiante pour la décongélation douce.
- Remplir un bac de glace et y déposer un tube 1,5 mL annoté « MIX ».
- Entourer d'aluminium une plaque 96 puits (réf 3441-40) - la déposer dans la glace.
- Vortexer 3 secondes + Centrifuger 3 sec amorces et tampon.
- Préparer le MIX en y déposant tous les réactifs et en respectant les volumes (Cf MO-8-CalculMix- PCR-TR-CHV-MC). Ajouter d'abord l'eau, puis le tampon, les amorces. Vortex 3 sec.
- Déposer 15 µL du Mix complet dans l'ensemble des puits et ajouter 5 µL d'eau dans les puits témoins (NTC) (Volume réactionnel total = 20 µL).
- Refermer l'aluminium sur la plaque 96 puits.
- Enlever la blouse dédiée à la salle mix.

### 2) Salle échantillon

#### Précautions

Lors des dépôts, **ne pas refouler jusqu'au 2e cran** de la pipette (évite les aérosol).

**Changer de cône** si contamination suspectée – Aller des négatifs aux témoins de gamme.

**Être parfaitement reproductible** pour les différents répliqués.

- Mettre la blouse dédiée à la salle échantillon.
- Désinfecter la paillasse et les pipettes avec du RnaseAway.
- Sortir les échantillons du congélateur, tiroir 2, -20°C boîte Gwendo-Gamme et boîte-CHV ADN LM/MC et les laisser décongeler à température ambiante.
- Vortex 3 secondes + Centrifugation 3 sec.
- Ajout des échantillons dans les puits de la plaque : 5 µL de chaque échantillon. Possibilité d'adapter aussi le volume en fonction des concentrations ; dans ce cas QSP à 5 µL avec de l'eau (tabler sur au moins 10 ng d'ADN total extrait et 100 ng d'ARN totaux)

Commencer par les témoins, puis les autres échantillons du plus concentré au moins concentré.

- Déposer un film plastique autocollant (dans sachet réf. *Biorad Microseal B Adhesive Sealer MSB-1001*), et appliquer le film verticalement et horizontalement sur toute la plaque avec un doigt ganté.

- Enlever la blouse - Aller dans la salle « clonage » pour centrifuger la plaque à 1000 rpm, 10 sec.

### 3) Programmation

- Allumer le lecteur PCR Biorad CFX, ouvrir le capot en appuyant sur le bouton rectangulaire, Déposer la plaque 96 puits et appuyer sur le même bouton pour fermer le capot.
- Allumer l'ordinateur et cliquer sur le logiciel Biorad CFX Manager.
- Programme (SYBR) : Cliquer sur « User Defined » puis sur « Select Existing », chemin d'accès : «Users>L.Martignat>Programmes>ALC-14-12-21 q-PCR classique ».
- Programmation de la plaque - Cliquer sur « Plaque » puis sur « Create New » : sélectionner les puits et le type d'échantillon du puits correspondant, dans « Sample Type ».
- Choisir : NTC (eau) / Negative Control / Positive Control /Standart / Unknown (échantillon à tester) - faire **entrée/load pour valider et afficher**.
  - Select fluorophores : cocher « **SYBR** ».
  - Choisir dans le menu déroulant où écrire le nom de l'amorce utilisée dans « Target Name » - **Entrée/load**.
  - Pour les standards, entrer la concentration - **Entrée/load**.
  - Enregistrer la plaque au nom de « plan plaque q-PCR... + date » dans Users>L.Martignat.
- Lancement du programme « Start Run » - enregistrer le fichier au nom existant («L Martignat\_2022-[date][heure]\_CT023420») + « Start Run » dans Users>L.Martignat.
- Attendre si possible le démarrage de la dénaturation initiale. Durée environ 100 min.

### 4) Traitement des données et envoi des résultats (2 fichiers)

- Aller sur la page des résultats « Data Analysis », puis sur l'onglet « Quantification ».
 

Pour exclure un puits de l'analyse des données, faire un clic droit sur le puits en question.

Sélectionner « Well » (clic gauche), puis cliquer sur « Exclude from analysis ».
- Appuyer sur la touche « Windows » ; ouvrir « Outil de capture ». Cliquer sur « Nouveau ».
- Sélectionner la page entière de résultats, ou seulement la partie souhaitée (tableau, graphique...) Dans « Data Analysis ».
- Enregistrer la capture et renommer « Capture PCR n°.../date/Initiales » dans Users>L Martignat>**Export résultats**.
- Retourner sur la page des résultats « Data Analysis » et cliquer sur « Export ».

Choisir « Custom Export ».

Choisir format Excel 2007 (\*.xlsx) - Sélectionner les données souhaitées.

Cliquer sur « Export » - Renommer : « Export PCR n°.../date/Initiales ».

Enregistrer dans Users>L Martignat>**Export résultats**.

#### **Exporter par clé USB**

- Aller dans Users>L Martignat>Export résultats.
- Sélectionner les fichiers souhaités, faire un clic droit puis cliquer sur « Copier ».
- Aller sur le fichier « clé USB », faire un clic droit et cliquer sur « coller ».

#### **Exporter par mail**

- Ouvrir l'application « Mozilla Thunderbird ».
- Cliquer sur « Écrire » puis rentrer les mails (étudiant + LM) qui vont recevoir les résultats.
- Cliquer sur Joindre>Users>L Martignat>Export résultats.
- Sélectionner les fichiers souhaités - taper sur « Entrée » - Cliquer sur « Envoyer ».

### **5) Plaque 96 puits**

Soit la congeler à -20°C pour une électrophorèse ultérieure, soit la jeter dans une poubelle jaune DASRI.





**Julia MANGIN**

RISQUE DE TRANSMISSION PAR LE CHIEN MALE DE L'HERPESVIRUS CANIN (CHV-1) : ETUDE DU POUVOIR INFECTIEUX DU SPERME ET MISE EN EVIDENCE DE SON EFFET INHIBITEUR SUR LA PCR

*RISK OF TRANSMISSION OF CANINE HERPESVIRUS (CHV-1) BY THE MALE DOG: STUDY OF THE INFECTIVITY OF SEMEN AND DEMONSTRATION OF ITS INHIBITORY EFFECT ON PCR*

**Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire** : Nantes, le 13 novembre 2024

## **RESUME**

L'objectif de cette étude est d'analyser la relation entre le CHV-1 et le sperme canin afin d'évaluer le risque de transmission par le chien mâle en reproduction. Trois axes principaux ont été explorés : (1) la capacité des spermatozoïdes à transmettre le virus, notamment après plusieurs lavages ; (2) la possible activité virucide du sperme canin ; et (3) le risque d'inhibition de la détection par PCR du virus en raison de la présence d'inhibiteurs dans le liquide spermatique.

La détection d'ADN viral dans le sperme suggère un potentiel de transmission du CHV-1 à la femelle lors de la reproduction. Cependant, nos résultats préliminaires in vitro indiquent que, malgré l'hypothèse d'une possible adhésion temporaire du virus à la surface des spermatozoïdes, le virus ne semble pas capable de pénétrer ou de se répliquer dans ces cellules après lavage. Le processus de lavages successifs réduit efficacement la charge virale.

L'étude d'un potentiel effet virucide du sperme a abouti à des résultats contradictoires entre les deux manipulations réalisées, pour l'une une inhibition de l'infection semble avoir eu lieu, tandis que des signes d'infection ont été constatés pour l'autre. De plus l'absence de détection lors de la PCR, au moins sur les témoins positifs, ne permet pas d'analyser plus en détail cette étude préliminaire. De nouvelles manipulations sont nécessaires.

Enfin, l'étude démontre que le liquide spermatique acellulaire (LSA) inhibe clairement la PCR temps réel EvaGreen®, avec une variabilité interindividuelle. La dilution du LSA permet de retrouver le signal PCR. Cette inhibition expose à un risque de faux négatifs lors de tests PCR sur le sperme.

## **MOTS CLES :**

- CHIEN
- SPERME
- HERPESVIRUS CANIN
- TRANSMISSION DES MALADIES
- REPRODUCTION
- REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE

**DATE DE SOUTENANCE** : le 13 novembre 2024