



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 15949

To cite this version :

Florentin, Simon. *La semence de taureaux infectés par Besnoitia besnoiti : moindre qualité et source de contamination ?* Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 90 p.

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

LA SEMENCE DE TAUREAUX INFECTÉS PAR *BESNOITIA BESNOITI* : MOINDRE QUALITÉ ET SOURCE DE CONTAMINATION ?

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

FLORENTIN Simon
Né, le 13 avril 1991 à Nancy (54)

Directeur de thèse : M. Philippe JACQUIET

JURY

PRESIDENT :
M. Alexis VALENTIN

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Philippe JACQUIET
Mme Nicole HAGEN

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VÉTÉRAIRE DE TOULOUSE**

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MILON Alain**, *Microbiologie moléculaire*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1^o CLASSE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2^o CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
- Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- M. **TANIS Jean-Benoît**, *Anatomie – Imagerie Médicale*

Remerciements

Aux membres du jury de thèse

A Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN,

Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse,
Praticien hospitalier au CHU de Toulouse,
Zoologie et parasitologie

Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Philippe JACQUIET,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Parasitologie et maladies parasitaires

Pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour vos conseils et votre intérêt pour ce travail.

Sincères remerciements.

A Madame le Professeur Nicole HAGEN-PICARD,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Pathologie de la reproduction

Pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse, pour vos conseils, votre disponibilité et votre réactivité.

Sincère reconnaissance.

Aux personnes ayant aidés à l'aboutissement de cette thèse

A Adriana ESTEBAN-GIL,

Pour ton implication dans les manipulations et dans la rédaction des articles.

A Madame le Docteur Patricia RONSIN,

Pour votre participation dans les manipulations et la lecture des lames.

A Monsieur le Professeur Xavier BERTHELOT,

Pour votre participation dans les manipulations et pour votre bonne humeur.

A Monsieur Faouzi LYAZRHI,

Pour votre aide dans l'interprétation des analyses statistiques.

A Adeline DECAUDIN,

Pour ton aide pendant les manipulations et le temps que tu as consacré à la lecture des lames.

Aux membres du FRGDS PACA et du GDS 04,

Nicolas CORBOZ, Maxime MAROIS, Marceline PEGLION, Carine VILARDELL,
Pour votre convivialité et l'organisation dont vous avez fait preuve en ce mois de septembre 2013.

Aux éleveurs du canton de Seyne-Les-Alpes,

Pour avoir transporté vos animaux jusqu'au centre de collecte et accepté de participer à l'étude.

Liste des publications et présentations concernant l'étude

- ESTEBAN-GIL, A., GRISEZ, C., PREVOT, F., FLORENTIN, S., DECAUDIN, A., PICARD-HAGEN, N., BERTHELOT, X., RONSIN, P., ALZIEU, J.P., MAROIS, M., CORBOZ, N., PEGLION, M., VILARDELL, C., LIÉNARD, E., BOUSHIRA, E., CASTILLO, J.A., FRANC, M. et JACQUIET, 2014. No detection of *Besnoitia besnoiti* DNA in the semen of chronically infected bulls. In : Parasitology research, 2014. Vol. 113, n° 6.
- ESTEBAN-GIL, A., JACQUIET, P., FLORENTIN, S., DECAUDIN, A., BERTHELOT, X., RONSIN, P., GRISEZ, C., PREVOT, F., ALZIEU, J.P., MAROIS, M., CORBOZ, N., PEGLION, M., VILARDELL, C., LIÉNARD, E., BOUSHIRA, E., CASTILLO, J.A., FRANC, M. et PICARD-HAGEN, N., 2016. Does bovine besnoitiosis affect the sexual function of chronically infected bulls? In : Theriogenology, 2016
- ESTEBAN-GIL, A., GRISEZ, C., PREVOT, F., FLORENTIN, S., DECAUDIN, A., PICARD-HAGEN, N., BERTHELOT, X., RONSIN, P., ALZIEU, J.P., MAROIS, M., CORBOZ, N., PEGLION, M., VILARDELL, C., LIÉNARD, E., BOUSHIRA, E., CASTILLO, J.A., FRANC, M. et JACQUIET, 30/06/2015-03/07/2015. The semen of *Besnoitia besnoiti* infected bulls: poor quality? source of infection?. In : Apicomplexan parasites in farm animal congress, 2015
- ESTEBAN-GIL, A., FLORENTIN, S., 7/11/2013. L'infection à *Besnoitia besnoiti* a-t-elle une influence sur la qualité du sperme chez le taureau ?. In : Congrès de la Journée Bovine Toulousaine, 2013

Table des matières :

Table des illustrations :	9
Liste des abréviations :	12
Introduction.....	13
Partie bibliographique.....	15
I. Présentation générale de la besnoitiose.....	15
1. Répartition géographique.....	15
2. Parasite.....	17
3. Clinique.....	18
a. Phase fébrile.....	18
b. Phase des œdèmes.....	18
c. Phase de sclérodémie.....	19
d. Autres formes.....	19
4. Importance de la besnoitiose.....	20
II. Examen de la fonction sexuelle du taureau.....	21
1. Anatomie (BARONE, 2001).....	21
a. Les enveloppes testiculaires.....	22
b. Les testicules.....	22
c. Les épидидymes et conduits déférents.....	24
d. La vascularisation.....	25
e. Les glandes annexes.....	25
2. La production de sperme.....	27
a. La spermatogenèse.....	27
b. Les spermatozoïdes et le plasma séminal (HAFEZ, 1987).....	29
3. Exploration de la fonction sexuelle du taureau.....	29
a. Examen de l'appareil génital (PICARD-HAGEN et BERTHELOT, 2011 ; DUMONT, 1997).....	29
b. Récolte de la semence (DUMONT, 1997).....	33
c. Examen de la semence.....	35
4. Conséquences de la besnoitiose sur la fonction sexuelle.....	39
Partie expérimentale.....	41
I. Matériel et méthodes.....	41
1. Locaux.....	41
2. Animaux.....	41
3. Examen des animaux.....	42
4. Récolte du sperme.....	43
5. Paramètres séminologiques.....	43
6. Evaluation de la fonction sexuelle.....	44
7. Sérologie (ELISA, Western-Blot).....	48
a. Tests ELISA.....	48
b. Western-Blot (LIENARD et al., 2011).....	49
8. qPCR.....	50
9. Analyses statistiques.....	51
II. Résultats et discussion.....	52

1. Sérologie vis-à-vis de <i>Besnoitia besnoiti</i>	52
2. Signes cliniques de besnoitiose	52
3. Recherche du parasite par qPCR.....	53
4. Lésions de l'appareil génital	55
5. Qualité du sperme	58
a. Volume de l'éjaculat	60
b. Concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat.....	61
c. Quantité de spermatozoïdes	63
d. Test de Schalm	65
e. Motilité massale	65
f. Motilité individuelle	68
g. Taux de mortalité des spermatozoïdes	69
h. Taux d'anomalies des spermatozoïdes	70
i. Score séminologique.....	73
6. Bilan	74
a. Paramètres séminologiques.....	74
b. Bilan général	76
Conclusion.....	79
Bibliographie.....	81
Annexes.....	87
I. Annexe I : Tableau décrivant les caractéristiques générales des 40 taureaux	87
II. Annexe II : Tableau décrivant le statut des 40 taureaux vis-à-vis de la besnoitiose	88
III. Annexe III : Tableau décrivant les lésions génitales des 40 taureaux	89
IV. Annexe IV : Tableau décrivant les paramètres séminologiques des 40 taureaux	90

Table des illustrations :

Figures :

Figure 1 : Pays où ont été décrits des cas de besnoitiose bovine (d'après RYAN et al., 2016 ; EFSA, 2010 ; THOMAS, 2007).....	15
Figure 2 : Carte indiquant le pourcentage d'élevages atteints de besnoitiose dans chaque commune entre 2002 et 2009 (d'après FOUQUET, 2009).....	16
Figure 3 : Carte représentant l'ensemble des communes touchées par la besnoitiose sur les départements 04 et 05, entre 2002 et 2009 (d'après FOUQUET, 2009).....	16
Figure 4 : Schéma représentant l'appareil génital du taureau (d'après CONSTANTINESCU, 2003).....	21
Figure 5 : Schéma d'un testicule de taureau, de l'épididyme et du canal déférent (d'après SAINT-DIZIER et CHASTANT-MAILLARD, 2014).....	23
Figure 6 : Schéma représentant la vessie et les glandes annexes du taureau (d'après POPESKO, 1972).....	26
Figure 7 : Schéma d'une coupe transversale de tube séminifère avec représentation des différents stades de la lignée germinale et leur localisation (d'après AMANN, 1983).....	28
Figure 8 : Schéma d'un électroéjaculateur à électrodes sur sonde rectale (Electrojac®) (d'après CUISENIER, 1996).....	34

Graphique :

Graphique 1 : Répartition des taureaux en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales pour les 3 groupes de taureaux (séronégatifs, séropositifs sans signe clinique et séropositifs avec signes cliniques).....	57
Graphique 2 : Influence de la concentration en spermatozoïdes sur la motilité massale des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation.....	67

Images échographiques :

Image échographique 1 : Coupe longitudinale de testicule de taureau sain.....	31
Image échographique 2 : Coupe longitudinale d'un testicule de taureau présentant des lésions de fibrose testiculaire.....	31
Image échographique 3 : Coupe longitudinale de vésicule séminale normale de taureau.....	32
Image échographique 4 : Coupe longitudinale de testicule de taureau sain.....	45
Image échographique 5 : Coupe longitudinale de testicule de taureau atteint de rares lésions de fibrose.....	45
Image échographique 6 : Coupe longitudinale de testicule de taureau atteint de lésions de fibrose modérées.....	46
Image échographique 7 : Coupe longitudinale de testicule de taureau atteint de lésions de fibrose sévères.....	46
Image échographique 8 : Coupe longitudinale de testicule de taureau atteint d'une	

dégénérescence testiculaire.....	46
Image échographique 9 : Tête épидидymaire de taureau présentant des structures kystiques.....	46

Photographies :

Photographie 1 : Face craniale de scrotum de taureau présentant de multiples abcès	47
Photographie 2 : Face caudale de scrotum de taureau présentant une hyperkératose sévère.....	47

Tableaux :

Tableau 1 : Anomalies recherchées lors de l'examen clinique de l'appareil génital mâle dans cette étude	32
Tableau 2 : Classification de la motilité massale des spermatozoïdes	36
Tableau 3 : Classification de la réaction au test de Schalm	37
Tableau 4 : Paramètres évalués lors d'un examen de sperme et leurs valeurs ou seuils usuels	38
Tableau 5 : Classification des taureaux en fonction des lésions génitales	45
Tableau 6 : Grille de calcul du score séminologique	47
Tableau 7 : Interprétation des tests ELISA en fonction du pourcentage de la réaction mesuré.....	49
Tableau 8 : Résultats de la qPCR sur biopsie cutanée chez les 40 taureaux en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose (11 séronégatifs, 17 séropositifs sans signe clinique et 12 séropositifs avec signes cliniques)	53
Tableau 9 : Lésions de l'appareil génital observées chez 40 taureaux.....	55
Tableau 10 : Nombre de stimulations nécessaires à l'éjaculation de 32 taureaux en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose	58
Tableau 11 : Nombre de stimulations électriques nécessaires à l'éjaculation de 32 taureaux en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales.....	59
Tableau 12 : Volumes des éjaculats (en ml) des 36 taureaux prélevés par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose	60
Tableau 13 : Volumes des éjaculats (en ml) des 36 taureaux prélevés par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales	61
Tableau 14 : Concentrations en spermatozoïdes (en milliard/ml) des éjaculats des 36 taureaux prélevés par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose.....	62
Tableau 15 : Concentrations en spermatozoïdes (en milliard/ml) des éjaculats des 36 taureaux prélevés par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales	62
Tableau 16 : Quantités de spermatozoïdes (en milliard) par éjaculat collecté sur 36 taureaux par électroéjaculation, en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose	64

Tableau 17 : Quantités en spermatozoïdes (en milliard) dans les éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales	64
Tableau 18 : Résultats des tests de Schalm réalisés sur les éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose	65
Tableau 19 : Motilités massales des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose	66
Tableau 20 : Motilités massales des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales	67
Tableau 21 : Motilités individuelles des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose	68
Tableau 22 : Motilités individuelles des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales	68
Tableau 23 : Pourcentage de spermatozoïdes morts dans les éjaculats collectés sur 30 taureaux par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose	70
Tableau 24 : Pourcentage de spermatozoïdes morts dans les éjaculats collectés sur 30 taureaux par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales	70
Tableau 25 : Taux d'anomalies des spermatozoïdes dans les éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose	71
Tableau 26 : Taux d'anomalies des spermatozoïdes dans les éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales	72
Tableau 27 : Scores séminologiques des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose	73
Tableau 28 : Scores séminologiques des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de leurs lésions génitales	74
Tableau 29 : Récapitulatif des différences observées entre les catégories de taureaux (statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose et lésions génitales) pour les paramètres séminologiques.....	75

Liste des abréviations :

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

FRGDS : Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire

GDS : Groupements de Défense Sanitaire

IFAT : Indirect Fluorescent Antibody Test, ou immunofluorescence indirecte

LVD : Laboratoire Vétérinaire Départemental

NEC : Note d'Etat Corporel

PACA : Provence-Alpes-Côte d'Azur

PCR : Polymerase Chain Reaction

v.u. : valeurs usuelles

Ct-value : threshold cycle value, ou valeur seuil de cycle (correspond au cycle au cours duquel la qPCR donne un résultat considéré positif)

cm : centimètre

kDa : kilodalton

MHz : mégahertz

ml : millilitre

mm : millimètre

°C : degré Celsius

Introduction

Au début des années 2000, la besnoitiose, maladie parasitaire due à *Besnoitia besnoiti*, protozoaire qui a pour hôte intermédiaire les bovins, est devenue enzootique en région Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA). Cette maladie n'entraîne qu'un faible taux de mortalité chez les bovins infectés (BIGALKE, 1968), mais elle se propage de manière insidieuse et atteint une proportion importante d'animaux et d'élevages dans les zones enzootiques. Par exemple, dans certaines régions du monde telles que l'Afrique du Sud ou Israël, la séroprévalence chez les bovins est respectivement de 72,3 % (JANITSCHKE et al., 1984) et de 76 % (NEUMAN, 1972) concernant les animaux.

La situation n'en est pas encore à ce stade en région PACA, mais d'après une récente étude séro-épidémiologique, la proportion des élevages contaminés était de 55 % et, dans ces élevages, 18 à 70 % des animaux seraient séropositifs (FOUQUET, 2009). Dans certaines communes, tous les élevages bovins étaient contaminés (FOUQUET, 2009).

Les pertes économiques engendrées par la besnoitiose sont considérables. En effet, même si la mortalité est faible, *Besnoitia besnoiti* est responsable d'une baisse de production importante, liée notamment à l'infertilité des taureaux infectés.

De plus, en région PACA, l'élevage bovin allaitant est relativement extensif et la monte naturelle est fréquemment utilisée dans les troupeaux. Les taureaux reproducteurs sont donc au milieu des femelles et exposés au parasite autant qu'elles. Il n'est alors pas rare que ces mâles soient séropositifs et porteurs de parasites dans les élevages atteints par la besnoitiose. Si l'animal développe une forme clinique de la maladie, une infertilité est présente pendant la phase aiguë et le taureau peut être réformé car devenu une non-valeur économique.

Mais lors d'infection asymptomatique ou subclinique, les éleveurs sont nombreux à conserver leur animal qui va continuer à saillir les femelles du troupeau, sans savoir si cette pratique constitue un risque important de contamination des vaches du troupeau, ni si la fonction de reproduction du taureau séropositif est atteinte.

L'objectif de cette étude est d'évaluer le risque de transmission du parasite par la semence des taureaux séropositifs et porteurs chroniques de *Besnoitia besnoiti*, et d'évaluer l'impact de ce portage chronique sur la fonction sexuelle des taureaux.

Pour cela, après une présentation bibliographique sur la besnoitiose et sur l'examen de la fonction sexuelle du taureau, nous présenterons l'étude expérimentale qui visait à rechercher *Besnoitia besnoiti* dans le sperme de 40 taureaux de la région PACA par PCR en temps réel, et à évaluer les paramètres séminologiques et les lésions de l'appareil génital de ces taureaux en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose.

Partie bibliographique

I. Présentation générale de la besnoitiose

La besnoitiose bovine est une maladie parasitaire due à un protozoaire, *Besnoitia besnoiti*, décrit pour la première fois en France en 1912 par Besnoit et Robin (BESNOIT, ROBIN, 1912). Elle atteint les bovins *Bos taurus* et *Bos indicus*.

1. Répartition géographique

Même si la première description du parasite a eu lieu en France, il s'agit principalement d'une maladie des pays chauds (Figure 1). Ainsi, elle a été décrite en Afrique Sub-Saharienne et en Asie. En Europe, les pays méditerranéens sont les principaux affectés, avec le Portugal (FRANCO, BORGES, 1915 ; CORTES et al., 2005), l'Espagne (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009), l'Italie (AGOSTI et al., 1994) et la France (BESNOIT, ROBIN, 1912). Mais ces dernières années, de nouveaux foyers ont été décrits en Allemagne (MEHLHORN et al., 2009), en Suisse (LESSER et al., 2012), et en Irlande (RYAN et al., 2016) suggérant une extension de la maladie. La besnoitiose est alors considérée comme une maladie émergente en Europe (EFSA, 2010).



Figure 1 : Pays où ont été décrits des cas de besnoitiose bovine (d'après RYAN et al., 2016 ; EFSA, 2010 ; THOMAS, 2007)

En France, la besnoitiose est enzootique dans le Sud-ouest depuis plusieurs siècles. Dans les années 1990, de nouveaux foyers ont été décrits dans le Massif Central et les Deux Sèvres et, en 2001, les Alpes ont vu leurs premiers cas de besnoitiose clinique. Ces quelques cas décrits dans les Alpes ont abouti à un foyer aujourd'hui conséquent (FOUQUET, 2009).

En effet, après plusieurs suspicions cliniques en 2001, la première confirmation rendue publique de besnoitiose en région PACA a eu lieu en 2002. Une cinquantaine de communes des Hautes-Alpes et des Alpes-de-Haute-Provence ont présenté des cas de besnoitiose entre 2002 et 2009 (Figures 2 et 3) avec tous les élevages contaminés dans certaines communes. Cette situation est particulièrement marquée aux alentours de Seyne-Les-Alpes, commune dans laquelle s'est déroulée notre étude.

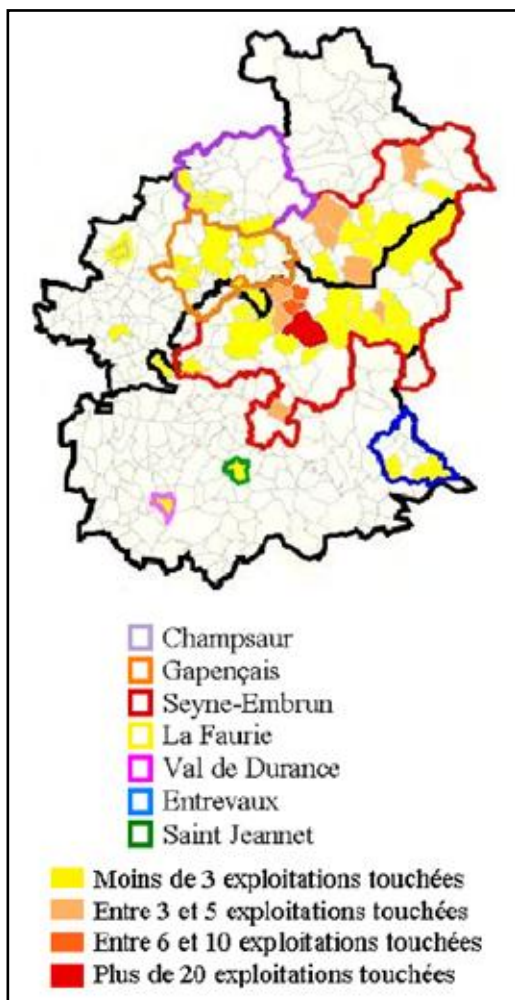


Figure 3 : Carte représentant l'ensemble des communes touchées par la besnoitiose sur les départements 04 et 05, entre 2002 et 2009 (d'après FOUQUET, 2009)

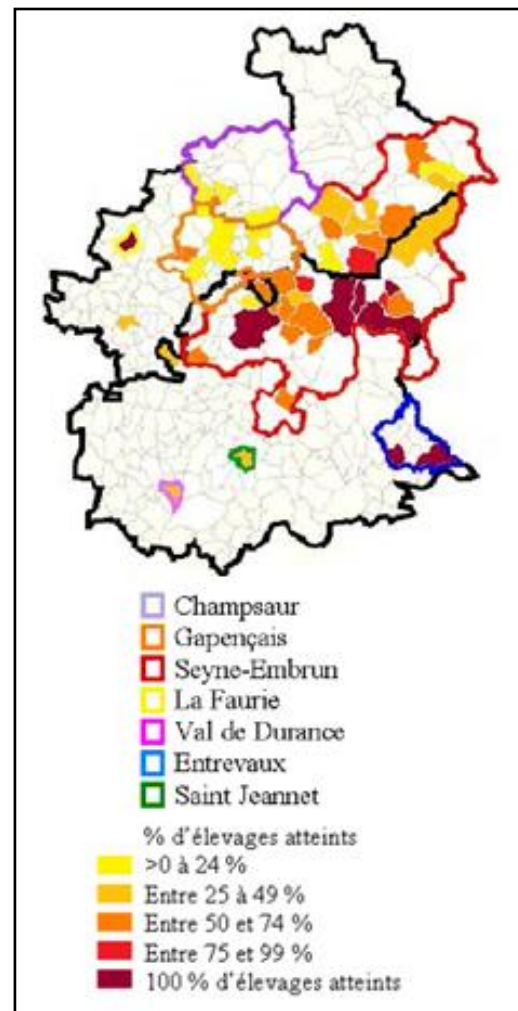


Figure 2 : Carte indiquant le pourcentage d'élevages atteints de besnoitiose dans chaque commune entre 2002 et 2009 (d'après FOUQUET, 2009)

2. Parasite

Besnoitia besnoiti est un protozoaire appartenant au Domaine des Eucaryotes, au Phylum des *Apicomplexa*, à l'Ordre des *Coccidae*, au sous-Ordre des *Eimeriorinae*, à la Famille des *Sarcocystidae*, à la sous-Famille des *Toxoplasmatinae* et au Genre *Besnoitia* (LENFANT, 2013 ; KASSAI et al., 1988).

En dépit de l'appartenance de *Besnoitia besnoiti* à une famille d'*Apicomplexa* dans laquelle il y a habituellement un hôte définitif, cet hôte n'est pas connu actuellement (BASSO et al., 2011 ; DIESING et al., 1988).

Chez un bovin, le parasite est présent sous deux formes : tachyzoïtes puis bradyzoïtes. Les tachyzoïtes se multiplient dans les cellules endothéliales et sont responsables d'une parasitémie qui permet un envahissement de tout l'organisme de l'hôte. Il y a formation de pseudo-kystes dans les endothéliums des capillaires sanguins de nombreux tissus tels que le foie, la rate, la conjonctive oculaire, la muqueuse nasale, la peau, les enveloppes testiculaires, les testicules (tissu interstitiel et tubes séminifères), les épидидymes (EUZEBY, 1987 ; KUMI-DIAKA et al., 1981). Au sein de l'appareil génital mâle, le scrotum et son contenu semblent les plus infestés, alors que le parasite n'a pas été mis en évidence dans l'urètre, les vésicules séminales et la prostate (KUMI-DIAKA et al., 1981).

Ces pseudo-kystes, contenant chacun plusieurs centaines de tachyzoïtes, induisent des lésions des cellules endothéliales, conduisant à leur nécrose et à la libération des tachyzoïtes qui pénètrent dans d'autres cellules. Les tissus environnants, privés de vascularisation, dégénèrent.

Il y a ensuite formation de bradyzoïtes. Il s'agit d'une forme parasitaire à multiplication plus lente qui s'accumule dans les fibroblastes et les histiocytes (ALZIEU et al., 2007). Dans ces cellules, plusieurs dizaines de milliers de bradyzoïtes sont contenus dans une vacuole parasitophore de la cellule hôte, elle-même entourée par une paroi épaisse d'origine parasitaire. La cellule infectée est également entourée par une réaction fibreuse de l'hôte. Ces kystes sont rencontrés dans les tissus contenant des fibroblastes, c'est-à-dire les tissus conjonctifs sous-cutanés, intermusculaires, la sclère oculaire, les tubes séminifères, mais aussi les muqueuses et la peau (derme essentiellement) (ALZIEU et al., 2007).

Seul le cycle de transmission entre bovins a été démontré à ce jour, et le mode de transmission dominant fait intervenir les insectes piqueurs (BIGALKE, 1968). Ces derniers, lors d'un repas de sang, souillent leurs pièces buccales avec des bradyzoïtes présents dans les kystes dermiques, ou avec des tachyzoïtes en cas de phase fébrile. En allant piquer un autre bovin, les parasites vont lui être transmis (GENEST, 2008). Cette infestation est aussi possible par l'intermédiaire d'aiguilles souillées. De plus, des modes de transmission sans vecteur sont également suspectés, tels que les contacts muqueux lors du léchage (CORTES et al., 2014) ou la mise bas (HORNOK et al., 2014).

3. Clinique

La besnoitiose clinique se manifeste en trois phases successives que sont la phase fébrile, la phase des œdèmes et la phase de sclérodermie.

a. Phase fébrile

Après une incubation de 6 à 10 jours, l'animal infecté souffre brutalement d'un état fébrile marqué avec des températures rectales pouvant atteindre 41,6°C pendant quelques jours. Un abattement, une tachypnée, une tachycardie et des troubles de la rumination sont alors observés. D'autres signes plus caractéristiques surviennent également, notamment une photophobie et des écoulements oculaires et pituitaires séro-muqueux (GOURREAU et al., 2000).

Cette phase correspond à la parasitémie liée à la multiplication des tachyzoïtes dans les cellules endothéliales. Les lésions vasculaires aboutissent à une congestion, des œdèmes et une inflammation des diverses zones concernées.

b. Phase des œdèmes

Après la phase fébrile survient la phase des œdèmes ou anasarque. Celle-ci est caractérisée par la formation d'œdèmes sous-cutanés sur la tête et dans les régions déclives telles que le scrotum, la mamelle, les ars et le fanon. Cette phase persiste pendant 1 à 4 semaines, avec une adénomégalie superficielle généralisée. Chez la femelle est également observée une cyanose des trayons qui deviennent

violacés à leur base. Chez le mâle, l'atteinte scrotale et testiculaire induit une baisse de fertilité (GOURREAU et al., 2000).

Cette phase est consécutive aux lésions endothéliales survenues pendant la phase fébrile.

c. Phase de sclérodermie

La troisième phase, phase de sclérodermie, est caractéristique de la maladie. Elle est également appelée phase des dépilations ou éléphantiasis, et correspond à une phase terminale de la besnoitiose clinique. Les œdèmes se résorbent mais les poils tombent et la peau perd toute souplesse et s'épaissit (GOURREAU et al., 2000). Les animaux atteints présentent alors des difficultés à se déplacer, leur peau se craquelle et ils finissent par mourir en quelques mois. Une infertilité transitoire ou définitive a également été décrite chez les taureaux affectés (KUMI-DIAKA et al., 1981).

Cette phase est liée à l'enkystement des bradyzoïtes dans le derme et les tissus conjonctifs de tout l'organisme, en particulier sous-cutanés. Les nombreux kystes provoquent la souffrance des tissus alentour par pression directe et inflammation.

d. Autres formes

La forme décrite précédemment est la forme clinique typique de la besnoitiose bovine mais ce n'est pas la plus fréquente. Dans les zones d'enzootie comme le Sud-Ouest de la France, la prévalence de ces cas cliniques serait de seulement 1 à 10 % par an (LEGRAND, 2003) alors que la proportion d'animaux infestés peut être très élevée (> 50 %, GENEST, 2008). Dans les zones d'émergence de la maladie, comme la région PACA, 15 à 20 % des animaux développeraient une besnoitiose clinique après leur contamination (JACQUIET et al., 2009).

Les nombreux animaux qui ne manifestent pas de signe clinique marqué peuvent présenter des kystes scléaux sans aucun autre symptôme, ou être complètement asymptomatiques.

4. Importance de la besnoitiose

La mortalité due à la besnoitiose est faible, inférieure à 10 % (EFSA, 2010). Cependant, les pertes économiques sont lourdes puisque la forme clinique de la maladie s'accompagne de pertes de production majeures et les animaux atteints deviennent des non-valeurs économiques même s'ils ne meurent pas. Et bien que la plupart des animaux ne développent pas de besnoitiose clinique, ils constituent un réservoir de bradyzoïtes que les insectes piqueurs vont pouvoir transmettre aux animaux sains. La propagation de la maladie est alors insidieuse, et lorsqu'un cas clinique se déclare, la prévalence dans l'élevage concerné est déjà importante, limitant les moyens de lutte et augmentant leurs coûts.

De plus, les taureaux atteints présentent une infertilité transitoire ou définitive (KUMI-DIAKA et al., 1981) qui peut être responsable de pertes économiques considérables dans les systèmes d'élevages extensifs ou pastoraux pratiquant la monte naturelle.

II. Examen de la fonction sexuelle du taureau

1. Anatomie (BARONE, 2001)

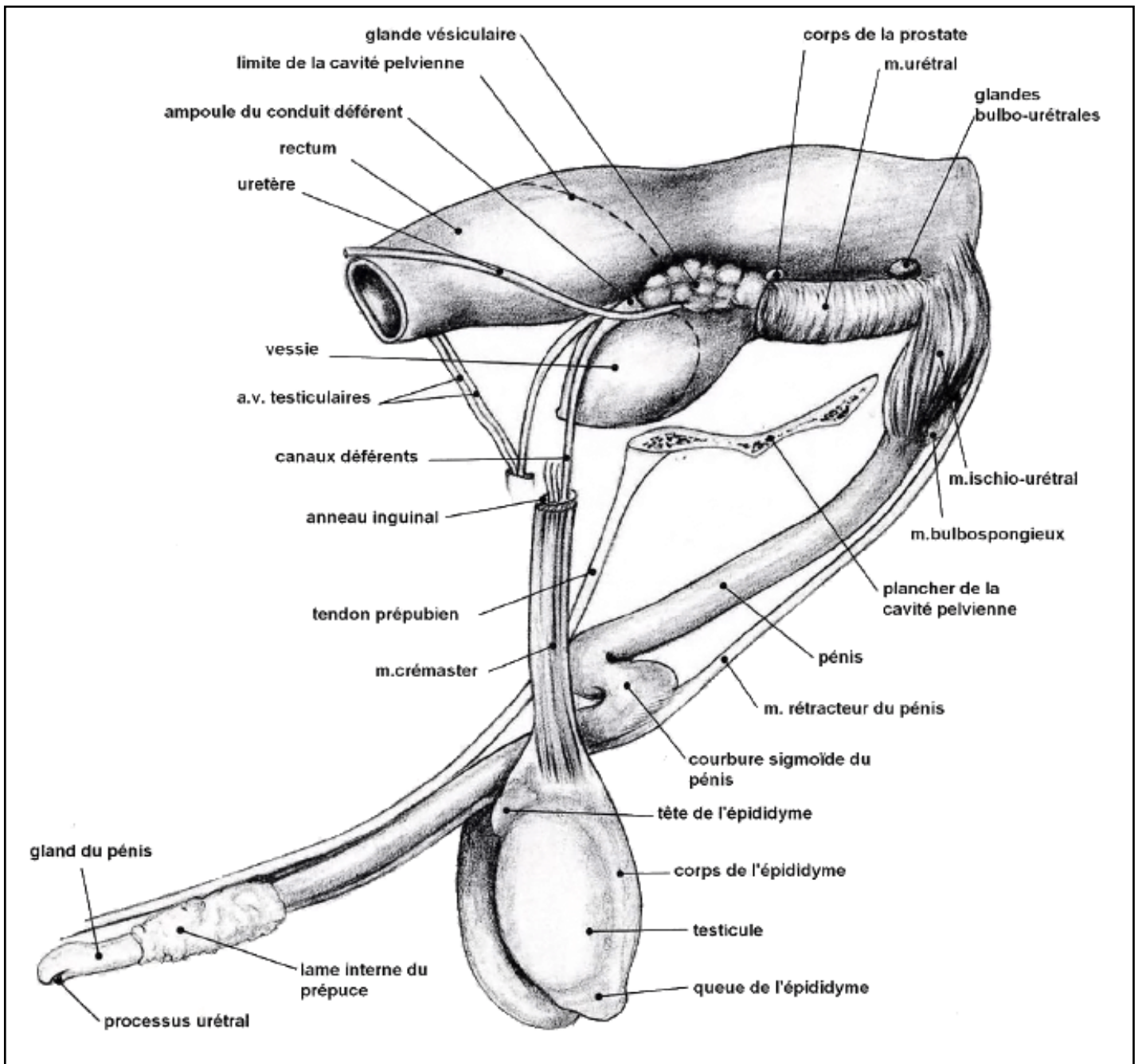


Figure 4 : Schéma représentant l'appareil génital du taureau (d'après CONSTANTINESCU, 2003)

a. Les enveloppes testiculaires

Les enveloppes testiculaires soutiennent et protègent les glandes sexuelles. Elles sont composées, de l'extérieur vers l'intérieur, du scrotum, de la tunique dartos, du fascia spermatique externe, du muscle crémaster, du fascia spermatique interne et de la tunique vaginale.

Chez le taureau, le scrotum est pendulaire entre ses cuisses. Il est non pigmenté et presque glabre.

La tunique dartos est un muscle capable de se contracter à partir de réflexes localisés, sous l'influence du froid notamment. Ces contractions participent à la thermorégulation testiculaire en faisant varier l'épaisseur du scrotum. Lors de ces contractions, de nombreuses rides transversales profondes apparaissent sur le scrotum. Cet aspect ridé doit être différencié d'un plissement lié à un épaissement de la peau scrotale consécutif à une hyperkératose.

Le fascia spermatique externe est très lâche chez le taureau, ce qui permet une mobilité importante des testicules dans la tunique dartos et la peau scrotale.

Le muscle crémaster est capable de contractions rapides et volontaires. Il est fonctionnellement relié au muscle oblique interne de l'abdomen et il se contracte en même temps que ce dernier, comme lors de toux, d'effort ou de coït.

La tunique vaginale permet une communication entre la cavité péritonéale et les testicules, par l'intermédiaire des canaux inguinaux.

b. Les testicules

Les testicules constituent les glandes génitales des mâles. Il s'agit d'un organe pair permettant la gamétogénèse et ayant une fonction endocrine, notamment la sécrétion de testostérone.

Chez le taureau, les testicules sont de forme ovoïde (Figure 4). Ils sont longs de 10 à 12 cm et larges de 6 à 8 cm. Leur consistance est ferme et élastique. Chaque glande pèse environ 280 g, mais les variations individuelles sont nombreuses. De plus, une différence de poids d'environ 5 % (15 g) est généralement observée entre les deux testicules d'un même taureau, sans pour autant signer une anomalie.

Les testicules sont verticaux dans le scrotum, avec l'extrémité capitée située dorsalement, où s'implante la tête de l'épididyme.

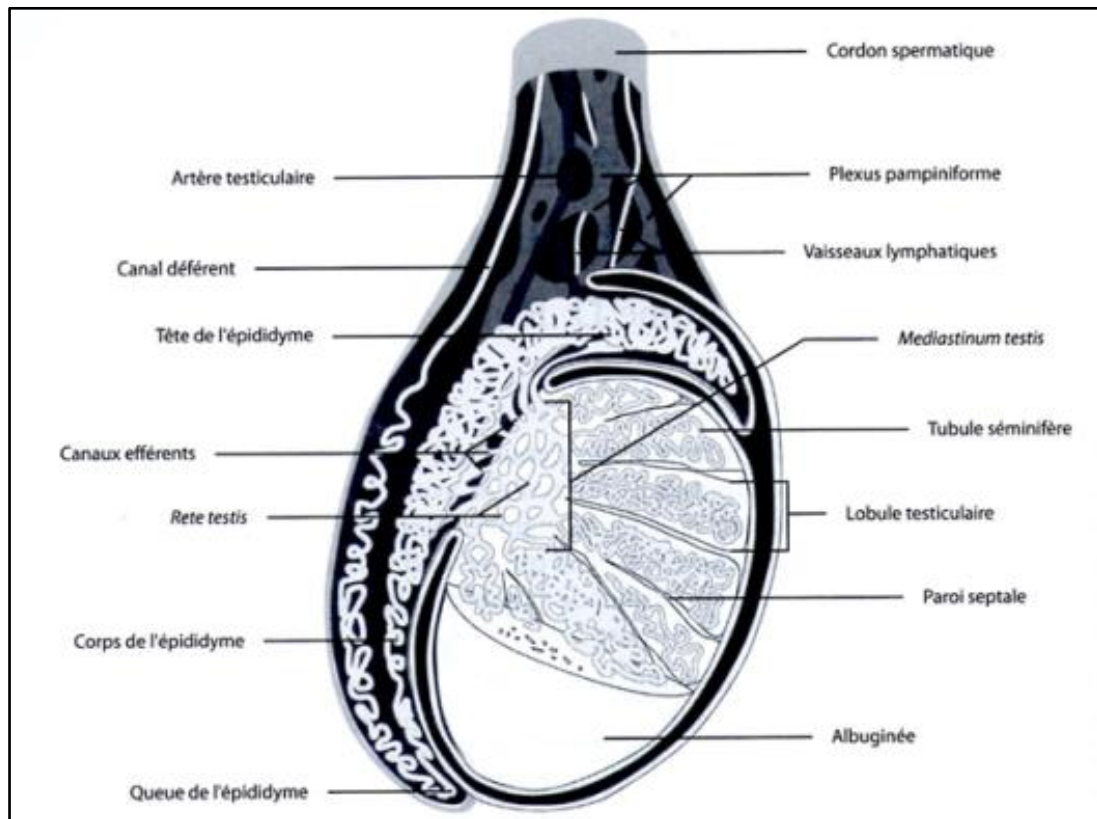


Figure 5 : Schéma d'un testicule de taureau, de l'épididyme et du canal déférent (d'après SAINT-DIZIER et CHASTANT-MAILLARD, 2014)

Chaque testicule est composé d'une tunique albuginée, de tubes séminifères et d'une trame conjonctive (Figure 5).

La tunique albuginée est la membrane fibreuse entourant la glande.

La trame conjonctive du testicule débute sur la face profonde de la tunique albuginée. Elle cloisonne le parenchyme en plusieurs centaines de lobules communiquant entre eux à leur base, base située à proximité de l'albuginée. Ces cloisons convergent vers le milieu du testicule où se trouve un axe conjonctif épais nommé *mediastinum testis*. La trame conjonctive contient la vascularisation testiculaire, les cellules interstitielles (anciennement cellules de Leydig, sécrétant la testostérone) et les tubes séminifères.

Ces tubes séminifères sont composés de deux parties. La première, la plus importante, concerne les tubes séminifères contournés. Ils débutent par des culs de sac près de l'albuginée et se prolongent jusqu'aux tubes séminifères droits, qui constituent la deuxième partie des tubes séminifères.

Les tubes séminifères contournés sont composés d'un épithélium spermatogène comprenant les cellules de soutènement (anciennement cellules de Sertoli) et les cellules de la lignée spermatogène.

Les tubes séminifères droits sont issus des tubes séminifères contournés. Ils constituent le premier segment des voies d'excrétion du sperme et débouchent dans le *rete testis*. Ce dernier, creusé dans le *mediastinum testis*, est le point de départ des canalicules efférents du testicule qui se rassemblent ensuite pour former le conduit épидидymaire dans l'épididyme.

c. Les épидидymes et conduits déférents

Les épидидymes sont accolés aux testicules. Chacun d'eux est composé d'une tête, d'un corps et d'une queue, contenant les conduits épидидymaires fortement circonvolutionnés. Ainsi, chez le taureau, chaque conduit épидидymaire mesure approximativement 45 m de long.

La tête est large chez le taureau et tend à recouvrir l'extrémité capitée du testicule correspondant. Elle reçoit les canalicules efférents.

Le corps est relié à la tête de l'épididyme. Il est plus étroit que cette dernière et longe la partie médiale du testicule sans y être totalement solidaire. Ces trois caractéristiques rendent sa palpation délicate contrairement à celle de la tête et de la queue épидидymaires.

La queue est quant à elle globuleuse et ferme. Elle est située à l'extrémité caudée de la glande, et se poursuit par le conduit déférent du côté médial du testicule.

Le conduit déférent s'abouche à la partie pelvienne de l'urètre après avoir traversé le canal inguinal, la région iliaque et la région pelvienne.

d. La vascularisation

Chaque testicule est irrigué grâce à l'artère testiculaire. Celle-ci a pour point de départ l'aorte abdominale, et atteint la glande sexuelle après un passage par le canal inguinal. A sa sortie de l'anneau inguinal externe, l'artère testiculaire décrit des flexuosités de plus en plus amples, nombreuses et serrées en approchant de la gonade. Le cône vasculaire, mesurant environ 15 cm chez le taureau, contient alors plus de 3,5 m d'artère testiculaire. Celle-ci atteint ensuite l'extrémité capitée du testicule où elle pénètre dans l'albuginée. A partir de cette tunique, elle atteint la charpente fibreuse de la glande pour rejoindre le *mediastinum testis*.

Les veines suivent également la charpente fibreuse pour sortir du testicule au niveau de son extrémité capitée. A cet endroit, elles se divisent pour former le plexus pampiniforme qui entoure l'artère testiculaire, ce qui permet le refroidissement du sang arrivant au testicule. La température optimale à la spermatogenèse est en effet de 2 à 6°C inférieure à la température corporelle du taureau.

e. Les glandes annexes

Les glandes annexes sont constituées des deux vésicules séminales, de la prostate et des deux glandes bulbo-urétrales (Figure 6).

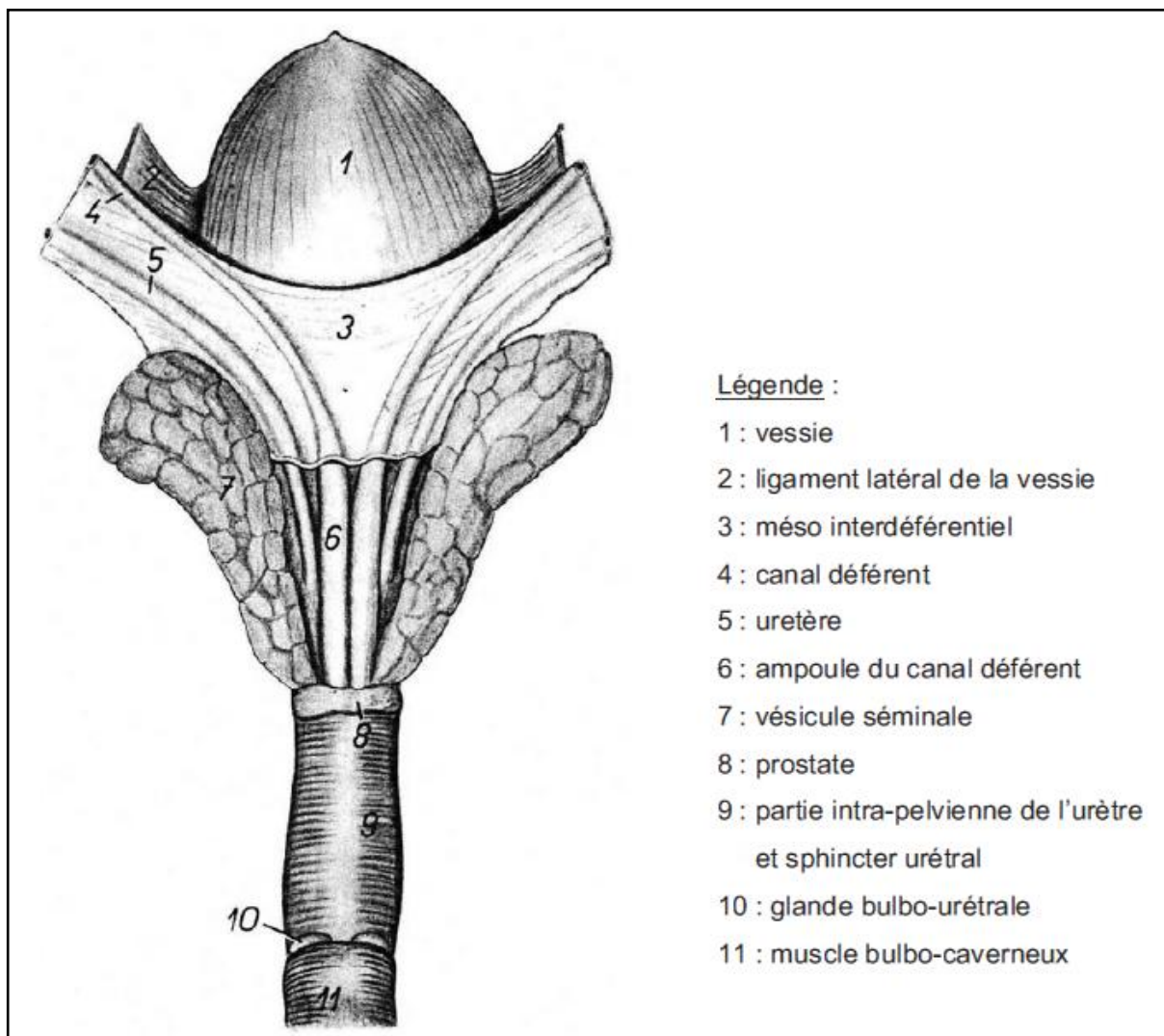


Figure 6 : Schéma représentant la vessie et les glandes annexes du taureau (d'après POPESKO, 1972)

Les vésicules séminales sont situées sur la face dorsale de la vessie et de son col. Elles se rejoignent dans leur partie caudale où elles s'annexent à la terminaison du conduit déférent. Chez le taureau, leur longueur est d'environ 10 cm pour une largeur de 2 à 4 cm. Leur consistance est ferme et elles sont fortement lobulées. Elles sécrètent un liquide blanc jaunâtre alcalin riche en fructose, constituant une source d'énergie pour les spermatozoïdes. Ce liquide contient également de la vésiculase, une enzyme participant à la coagulation du plasma séminal après l'éjaculation.

La prostate comprend une partie conglomérée bilobée, appelée corps de la prostate, et une partie disséminée. Chez le taureau, le corps est peu développé. Il n'excède pas 3 à 4 cm de largeur et 1,5 cm de longueur et de hauteur. Il couvre la

face dorsale de l'urètre à son départ, et légèrement ses faces latérales. Sa consistance est ferme et les deux lobes ne sont pas distinguables à la palpation transrectale. La partie disséminée de la prostate est dans la continuité de la partie conglomérée et s'étend caudalement sur environ 12 cm dans l'épaisseur de la paroi urétrale.

Les glandes bulbo-urétrales sont petites, elles mesurent 3 cm de long sur 1,5 cm de large chez le taureau. Elles sont situées sur la face dorsale de l'urètre, proche du bulbe du pénis.

2. La production de sperme

a. La spermatogenèse

La spermatogenèse a lieu dans les tubes séminifères contournés. Elle se déroule en trois étapes : la spermatocytogenèse, la méiose et la spermiogenèse. Les cellules germinales subissent la spermatogenèse au voisinage de la membrane limitante du tube séminifère et progressent ensuite vers sa lumière. Ce déplacement est permis par les cellules de soutien. Chez le taureau, après 54 jours de différenciation (CLERMONT, 1972), les spermatozoïdes sont libérés de la trame des cellules de Sertoli.

La spermatocytogenèse est l'étape au cours de laquelle les spermatogonies subissent plusieurs mitoses et produisent les spermatocytes primaires. Ce type cellulaire est diploïde et est celui qui va subir la méiose.

La méiose permet le passage à l'haploïdie. La première étape de cette phase, la prophase 1, est longue : 19 jours chez le taureau. Puis les étapes suivantes sont courtes et aboutissent à la formation de deux spermatocytes secondaires par spermatocyte primaire. Les spermatocytes secondaires subissent la deuxième division de méiose très rapidement pour donner des spermatides qui, elles, ne se multiplient plus.

La spermiogenèse transforme les spermatides en spermatozoïdes en environ 19 jours. Il y a passage de cellules rondes à noyau sphérique à des cellules de petite

taille et longuement flagellées, composées d'une tête, d'une pièce intermédiaire et d'une queue.

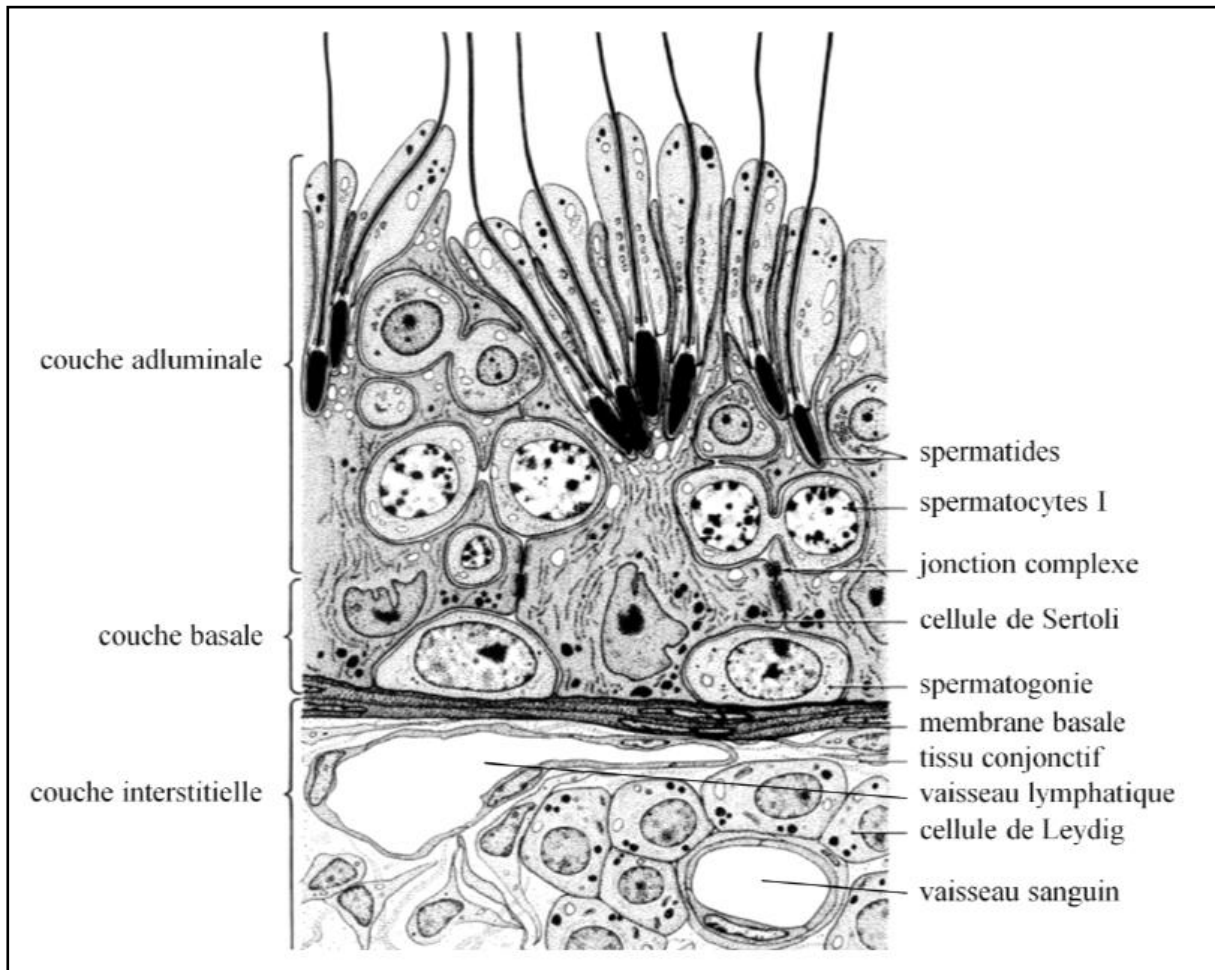


Figure 7 : Schéma d'une coupe transversale de tube séminifère avec représentation des différents stades de la lignée germinale et leur localisation (d'après AMANN, 1983)

Les spermatozoïdes nouvellement formés atteignent la lumière des tubes séminifères contournés (Figure 7), puis les tubes séminifères droits, la *rete testis*, les canalicules efférents et enfin le conduit épидидymaire. Au sein de l'épididyme, les spermatozoïdes mûrissent et acquièrent leur pouvoir fécondant. Ils gagnent notamment en efficacité glycolytique, ce qui leur permet d'utiliser les substrats énergétiques présents dans le sperme.

La progression de la tête à la queue dure environ 13,5 jours (CLERMONT, 1972), puis les spermatozoïdes sont stockés dans la queue de l'épididyme entre les éjaculations.

Enfin, en phase préliminaire d'une éjaculation, il y a contraction de l'épididyme, ce qui chasse les spermatozoïdes vers le conduit déférent dont la musculature, très épaisse, permet l'éjection des spermatozoïdes.

b. Les spermatozoïdes et le plasma séminal (HAFEZ, 1987)

Les spermatozoïdes contenus dans la queue de l'épididyme possèdent un pouvoir fécondant comparable à celui de spermatozoïdes extraits d'un éjaculat. Le rôle du plasma séminal, qui correspond à la fraction liquide de la semence sans les spermatozoïdes, dépend du lieu de dépôt du sperme dans les voies génitales femelles (FOURNIER-DELPECH et al., 1979). En effet, lors d'une insémination artificielle dans l'espèce bovine, le sperme est déposé directement dans l'utérus contrairement à une saillie naturelle pour laquelle il est déposé dans le vagin. Dans ce cas, le plasma séminal a un rôle important dans le transport et la protection des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles (RICKARD et al., 2014). Il leur apporte l'énergie et le support grâce auxquels ils vont pouvoir se déplacer (KNOBIL, NEILL, 1988).

Le plasma séminal est constitué d'un mélange de fluides ayant pour origines les testicules, les épидидymes, les ampoules déférentes, les vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo-urétrales.

Composé majoritairement d'eau, le plasma séminal contient une multitude de composants. Il contient notamment une quantité importante de fructose sécrétée par les vésicules séminales, glucide qui sera dégradé par glycolyse par les spermatozoïdes. Le plasma séminal contient également de la sialomucine, substance sécrétée par les glandes bulbo-urétrales et participant à la gélification du sperme après son émission. Les sécrétions des autres glandes annexes permettent notamment l'iso-osmolarité et le contrôle du pH du plasma, et contiennent de nombreux composants dont le rôle n'est parfois pas complètement élucidé.

3. Exploration de la fonction sexuelle du taureau

a. Examen de l'appareil génital (PICARD-HAGEN et BERTHELOT, 2011 ; DUMONT, 1997)

L'examen de la fonction sexuelle d'un taureau doit inclure un examen clinique général. En effet, les troubles de la reproduction du mâle ne sont pas forcément liés à une atteinte génitale, ils peuvent notamment être dus à des anomalies de l'appareil locomoteur.

L'anamnèse prend en compte la race, l'âge, la note d'état corporel du taureau et le nombre de femelles qu'il doit saillir. Elle se focalise ensuite sur les performances reproductrices du taureau la saison précédente. En cas de suspicion d'un problème de fertilité, trois situations doivent être envisagées : une libido insuffisante, une impossibilité de saillie ou des saillies non fécondantes.

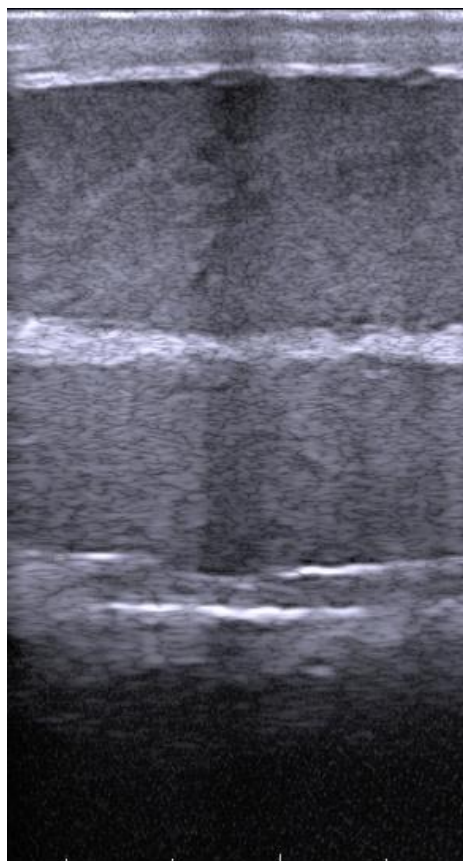
L'insuffisance de libido est mise en évidence par une absence de tentative de chevauchement après 10 minutes de contact avec une femelle en chaleur, ou moins de 2 tentatives après 15 à 20 minutes.

Une impossibilité de saillie peut être due à des problèmes locomoteurs empêchant le saut, ou à une incapacité d'érection, d'extériorisation ou d'intromission du pénis. Celles-ci ont principalement pour origine un obstacle au niveau de l'orifice préputial, une balanoposthite ou un traumatisme du pénis qui rendent l'érection douloureuse, des anomalies du pénis (trop court, dévié, persistance du frein préputial) ou des anomalies des muscles rétracteurs du pénis.

Les troubles de reproduction du mâle avec des saillies normales nécessitent un examen attentif de l'appareil génital. Le scrotum doit être examiné et palpé à la recherche d'anomalies cutanées (abcès, plaies, hyperkératose, tuméfaction, etc.). La circonférence scrotale peut ensuite être mesurée. Elle constitue un indicateur pertinent de la capacité de production de spermatozoïdes du taureau (WALDNER et al., 2010 ; WILLETT, OHMS, 1957). Un seuil minimal de 33 cm est admis pour un taureau de plus de 2 ans (COULTER et al., 1987). Pour cela, les testicules sont descendus au fond du scrotum et le plus grand diamètre scrotal est mesuré au mètre-ruban.

Ensuite, une mobilisation des testicules doit être effectuée. Ceux-ci doivent être facilement mobilisables dans le scrotum. Leur palpation doit être ferme et élastique, et non douloureuse. Les épидидymes (tête et queue) doivent aussi être palpés, à la recherche de douleur, d'une asymétrie ou d'une grosseur évocatrice d'un kyste.

L'échographie est un outil complémentaire de la palpation. Elle permet de confirmer les anomalies suspectées à la palpation et de détecter des anomalies subcliniques telles que des lésions de fibrose et de calcification du parenchyme testiculaire (Images échographiques 1 et 2).



Scrotum
Vaginale

Mediastinum testis

Septum

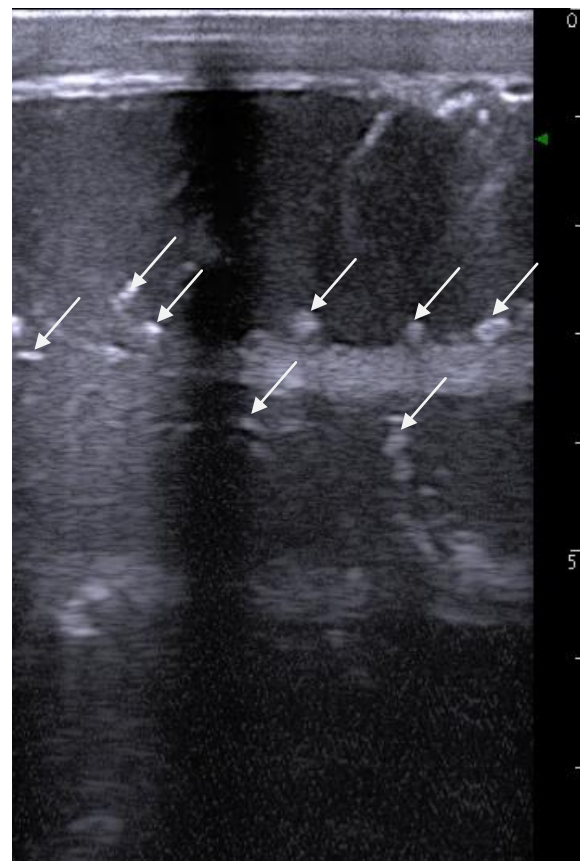


Image échographique 1 : Coupe longitudinale d'un testicule de taureau sain

Image échographique 2 : Coupe longitudinale d'un testicule de taureau présentant des lésions de fibrose testiculaire (flèches)

L'échographie des testicules est réalisée en coupes longitudinales : le scrotum et les enveloppes testiculaires apparaissent en haut de l'image, suivi du parenchyme testiculaire ayant une échogénicité modérément homogène, grisée, moins échogène que le *mediastinum testis*. Ce dernier apparaît au centre du testicule. Il est la structure la plus échogène et apparaît comme un trait d'environ 2 à 4 mm d'épaisseur.

Les lésions de fibrose du parenchyme testiculaire apparaissent comme des ponctuations hyperéchogènes dans le parenchyme (flèches sur l'image ci-dessus).

Les épидidymes sont également observés, en particulier leur tête et leur queue puisque leur corps est difficilement visualisable.

Après cet examen de l'appareil génital externe, une palpation transrectale peut être entreprise. Elle permet la palpation des glandes annexes que sont la prostate et les vésicules séminales. La taille de la prostate et la taille, la symétrie et la mobilité des vésicules séminales doivent être évaluées. Pour ces dernières, la lobulation doit être perceptible. Une échographie peut également être réalisée (Image échographique 1).

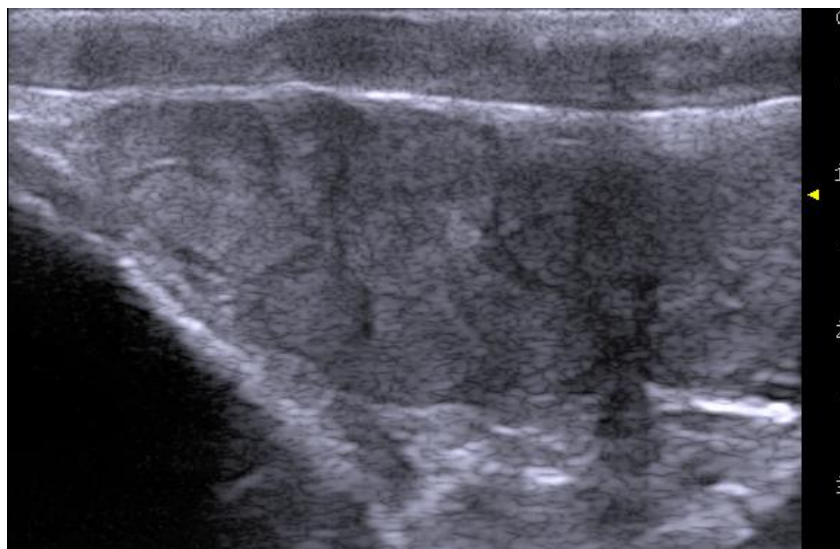


Image échographique 3 : Coupe longitudinale de vésicule séminale normale de taureau

Le Tableau 1 récapitule les anomalies décrites précédemment et à rechercher lors de l'examen clinique de l'appareil génital d'un taureau.

Tableau 1 : Anomalies recherchées lors de l'examen clinique de l'appareil génital mâle dans cette étude

Examen du fourreau	Obstacle à l'extériorisation du pénis Signes d'une inflammation, d'adhérences
Examen du pénis	Persistance du frein préputial Signes d'une inflammation Traumatismes, déviation, fibropapillome
Examen du scrotum	Abcès ou plaies cutanés Hyperkératose Œdème ou autre tuméfaction
Examen des testicules	Douleur Modification de taille et absence de symétrie Adhérence, perte de mobilité
Examen des épидидymes	Douleur Modification de taille et absence de symétrie
Examen du cordon vasculaire	Modification de taille
Examen de la prostate	Douleur Modification de taille
Examen des vésicules séminales	Douleur, adhérences Absence de symétrie Perte de la lobulation

b. Récolte de la semence (DUMONT, 1997)

Sur les taureaux de monte naturelle, la récolte d'un éjaculat est destinée à l'examen séminologique ou à la recherche d'agents pathogènes. Elle permet également de contrôler la libido et la capacité d'éjaculation du taureau.

Plusieurs méthodes de collecte existent. La méthode de référence est la récolte au vagin artificiel qui consiste à reproduire les conditions physiologiques présentées par l'appareil génital femelle lors du coït. Le taureau est présenté à un animal d'excitation, appelé « boute-en-train » et lors du chevauchement, son pénis est dévié et coiffé par le vagin artificiel. Celui-ci est composé de deux manchons en caoutchouc formant un cylindre dont la paroi est remplie d'eau à 40-42°C et reproduit les conditions de chaleur et de pression du vagin. Pendant l'éjaculation, le sperme est recueilli dans un tube gradué relié à une extrémité du cylindre.

Une autre méthode relativement courante est l'électroéjaculation. Elle consiste à stimuler électriquement les centres nerveux responsables de l'érection et de l'éjaculation (RIGAL, 2008), qui ont des points de départ médullaires lombaire (entre L1 et L2) et sacré (entre S2 et S3). Pour cela, des électrodes sont placées dans le rectum du taureau. La stimulation de la zone dorso-caudale au corps de la prostate provoque l'érection, et celle de la zone crâniale à la prostate, en regard des ampoules déférentes, provoque l'émission du sperme dans l'urètre. Pour y parvenir, deux grands types d'électrodes sont utilisés : des électrodes fixées sur la main, permettant de stimuler une zone précise et limitée, et des électrodes sur sonde rectale (Figure 8).

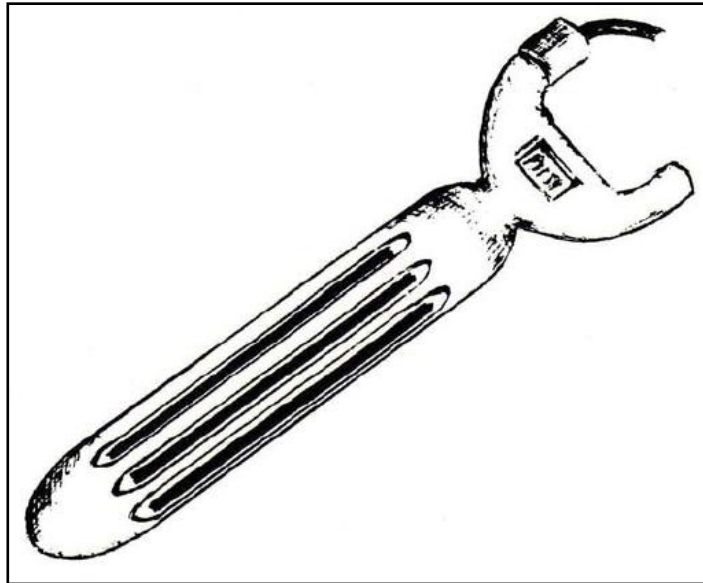


Figure 8 : Schéma d'un électroéjaculateur à électrodes sur sonde rectale (Electrojac®) (d'après CUISENIER, 1996)

Cette deuxième catégorie d'électrodes permet une plus grande sécurité pour l'opérateur en limitant les risques de blessures liées à l'électricité ou à la chute de l'animal. Mais elle occasionne un plus grand nombre de contractions musculaires non souhaitées (EASLEY, 1970). Afin de réduire ces effets secondaires, la tension électrique appliquée par les électrodes est modulable de manière à trouver un compromis entre une stimulation suffisante permettant l'éjaculation, mais tout de même limitée pour ne pas générer trop de contractions musculaires, de brûlures de la muqueuse rectale voire d'électrocution. La contention doit également être maîtrisée pour assurer la sécurité du taureau et des opérateurs.

Deux programmes de stimulations sont proposés pour les électroéjaculateurs actuels : automatique et manuel. Le mode automatique est généralement recommandé. Il génère une série de 32 stimulations de 2 secondes espacées par des périodes de repos de 2 secondes. A chaque nouvelle stimulation, la tension augmente pour atteindre un maximum d'une vingtaine de volts en général. La tension à laquelle se produit l'éjaculation est variable selon l'individu, et il est parfois nécessaire d'effectuer plusieurs cycles complets de stimulations pour provoquer l'éjaculation. De plus, il arrive que l'érection soit absente. Dans ce cas, un opérateur peut essayer de favoriser l'extériorisation du pénis en appuyant sur l'inflexion sigmoïde.

De la même façon que pour la récolte au vagin artificiel, le sperme est recueilli par un opérateur placé sur le côté du taureau. Un entonnoir disposé sur un support rigide est placé à l'extrémité du pénis ou en dessous de l'orifice préputial, cet entonnoir étant relié à un tube gradué dans lequel sera récupéré l'éjaculat. L'avantage principal de cette technique est qu'elle ne nécessite pas d'habituation préalable de l'animal, contrairement à la technique du vagin artificiel. Mais l'électroéjaculation présente plusieurs inconvénients : elle peut induire des contractions involontaires, elle ne permet pas toujours d'obtenir une éjaculation et dans ce cas il est impossible de différencier un simple échec technique d'une incapacité réelle du taureau à éjaculer. De plus, lors d'électroéjaculation, le volume de l'éjaculat peut être augmenté et sa concentration en spermatozoïdes diminuée (RIGAL, 2008), ce qui modifie l'appréciation de la qualité séminologique (BARTH, 2007). Ces variations sont principalement dues à une sécrétion accrue des glandes annexes pendant la stimulation de l'animal.

D'autres méthodes plus anecdotiques sont décrites pour récolter du sperme chez un taureau, telles que le massage transrectal. Cette méthode consiste, chez un taureau calme et docile, à masser les vésicules séminales, les ampoules déférentes et la prostate en réalisant des allers-retours avec la main. Cette technique ne fonctionne pas chez tous les taureaux, et après un massage de 3 minutes sans éjaculation, il est conseillé de passer à une autre méthode (BARTH, 2007).

c. Examen de la semence

Le volume de l'éjaculat est obtenu directement sur le tube gradué. Les valeurs usuelles varient de 3 à 8 ml de sperme par éjaculat, chez un taureau en monte naturelle. En cas de récolte par électroéjaculation, la valeur est difficilement interprétable.

La concentration en spermatozoïdes est généralement estimée par spectrophotométrie chez le taureau. La semence est qualifiée de très bonne si elle contient plus de 750 millions de spermatozoïdes par millilitre, de bonne si elle en contient entre 400 et 750 millions/ml, de moyenne entre 250 et 400 millions/ml et de pauvre en dessous de 250 millions/ml (BARTH, 2007). Comme pour le volume, la

concentration est difficilement interprétable sur le sperme collecté par électroéjaculation.

La motilité massale est le reflet de la concentration en spermatozoïdes, du taux de spermatozoïdes en mouvement et de leur vitesse. Elle est évaluée en observant au microscope à faible grossissement (x100) une goutte de sperme de 5 à 10 mm de diamètre déposée sur une lame maintenue à 37°C. Le diaphragme du microscope doit être fermé pour augmenter le contraste. 6 notes décrivent l'intensité des vagues provoquées par le déplacement des spermatozoïdes en périphérie de la goutte (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification de la motilité massale des spermatozoïdes

Motilité massale	Observation microscopique
0	Aucun mouvement
1	Légers mouvements sans vague
2	Vagues peu nombreuses
3	Vagues nombreuses
4	Vagues rapides et intenses
5	Tourbillons très rapides

En monte naturelle, un sperme dont la note est inférieure à 2 indique une mobilité insuffisante. Cependant, lorsqu'un des trois paramètres responsables de la motilité massale est faible, comme la concentration lors d'électroéjaculation par exemple, la note est fortement modifiée (BARTH, 2007). C'est pourquoi un autre paramètre peut être utilisé pour décrire la mobilité des spermatozoïdes : la motilité individuelle.

La motilité individuelle s'apprécie en estimant la proportion de spermatozoïdes fléchants, c'est-à-dire mobiles et se déplaçant en ligne droite de façon à traverser le champ d'observation. Pour cela, une goutte de sperme dilué est placée entre une lame maintenue à 37°C et une lamelle afin d'individualiser les spermatozoïdes. Cette goutte est observée au microscope à fort grossissement (x100 à x400). La motilité individuelle dépend notamment du taux de spermatozoïdes morts et anormaux. Une note inférieure à 30 à 40 % est considérée comme insuffisante.

La motilité peut être diminuée si les conditions de lecture ne sont pas maîtrisées, par exemple à cause d'une lame trop froide ou contenant du détergent suite à un lavage, ou à cause de la présence d'urine dans l'éjaculat lors d'électroéjaculation par exemple. En outre, en l'absence de substrat énergétique, la motilité diminue rapidement. Il est donc nécessaire de l'évaluer dès l'obtention de la semence.

Le test de Schalm permet de mettre en évidence la présence de cellules inflammatoires dans la semence, signalant une inflammation de l'appareil génital. Equivalent du Californian Mastitis Test dans le lait, le test de Schalm est réalisé en mélangeant du Na-Teepol, un détergent, au sperme. Les membranes cellulaires sont détruites et l'ADN est mis en évidence par la formation de grumeaux et par l'augmentation de la viscosité du mélange. L'ADN des spermatozoïdes, très condensé, ne réagit pas avec le Na-Teepol.

La réaction au test de Schalm est classée en 5 catégories (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification de la réaction au test de Schalm

Test de Schalm	Observation macroscopique
0 = négatif	Mélange fluide sans grumeau
1 = Schalm 1+	Présence de grumeaux fugaces qui disparaissent en une minute, mélange fluide
2 = Schalm 2+	Présence de grumeaux nets et persistants, mélange fluide
3 = Schalm 3+	Présence de gros grumeaux, mélange visqueux (aspect « blanc d'œuf »)
4 = Schalm 4+	Prise en masse du mélange

Les notes 0 et 1+ sont considérées comme normales.

Les critères suivants nécessitent une préparation du sperme. En effet, les taux d'anomalies morphologiques et de mortalité ne sont pas facilement évaluables sans coloration, les spermatozoïdes étant translucides et de même aspect qu'ils soient vivants ou morts. Pour les différencier, le colorant couramment utilisé associe la

nigrosine, qui met en évidence les spermatozoïdes en colorant le fond de la lame, et l'éosine, qui permet de différencier les spermatozoïdes morts des vivants, leur membrane étant perméable au colorant.

La valeur seuil du pourcentage de spermatozoïdes morts en dessous de laquelle la semence est considérée de bonne qualité est de 40 %.

Il peut cependant se produire des artéfacts lors de la coloration : si le taux de mortalité des spermatozoïdes est élevé et non compatible avec la motilité individuelle de la semence, cela évoque une mauvaise préparation de la semence (BARTH, 2007) qui a induit une mortalité, notamment lors de sa coloration.

Le taux d'anomalies morphologiques est déterminé au microscope à fort grossissement (x1000, à immersion). La lecture de 100 à 200 spermatozoïdes est conseillée pour repérer des anomalies même relativement peu fréquentes (BARTH, 2007). Plusieurs classifications des anomalies existent : l'une d'entre elles repose sur la localisation des anomalies (tête, pièce intermédiaire, queue) ; une autre sur l'origine de l'anomalie pendant la spermatogenèse (primaire si l'anomalie est liée à un dysfonctionnement pendant la phase testiculaire, secondaire pendant la phase épидидymaire).

Globalement, un taux d'anomalies inférieur à 20 à 40 % est considéré comme acceptable.

Le Tableau 4 récapitule les valeurs ou seuils usuels des paramètres séminologiques évoqués.

Tableau 4 : Paramètres évalués lors d'un examen de sperme et leurs valeurs ou seuils usuels

Paramètres	Valeurs usuelles chez un taureau en monte naturelle (HOPKINS, SPITZER, 1997)
Volume	3 à 8 ml
Couleur	Blanc laiteuse à jaunâtre
Consistance	Laiteuse à crémeuse
Motilité massale	2 à 5
Motilité individuelle	> 30 à 40 %
Concentration	> 0,3 milliard/ml
Pourcentage de morts	< 40 %
Pourcentage d'anomalies	< 20 à 40 %
Test de Schalm	0 à 1+

4. Conséquences de la besnoitiose sur la fonction sexuelle

La première phase de la besnoitiose clinique est une phase fébrile, avec des températures corporelles dépassant les 40°C. Ces températures très élevées, en plus de réduire la libido, entraînent une dégénérescence des spermatogonies B et des spermatoocytes pendant la méiose (WAITES et al., 1968). Une infertilité est donc possible à la suite de cette première phase de la besnoitiose, et peut persister plusieurs mois (ROSS, ENTWISTLE, 1979).

En phase de sclérodermie, les kystes sont responsables d'un épaissement cutané. La sclérodermie et l'hyperkératose atteignent en particulier la peau scrotale, zone essentielle à la thermorégulation testiculaire. Physiologiquement, cette peau est fine et presque glabre, avec une vascularisation superficielle capable d'une vasodilatation importante qui augmente les échanges thermiques en cas de besoin. De plus, la contraction des muscles scrotaux permet de faire varier l'épaisseur scrotale, modulant la régulation thermique (PETER, 2007).

Mais lors de sclérodermie et d'hyperkératose liées à la présence de kystes, l'épaisseur scrotale augmente, une partie des vaisseaux sanguins est nécrosée et la réaction inflammatoire associée modifie l'épaisseur cutanée. La thermorégulation est alors altérée avec une potentielle élévation de la température testiculaire. Cette élévation modérée affecte peu la phase épидидymaire mais affecte fortement la phase testiculaire, c'est-à-dire la spermatogenèse (VOGLER et al., 1991 ; ROSS, ENTWISTLE, 1979) : il y a une baisse de production de spermatozoïdes, une diminution de leur motilité, une augmentation du nombre de morts, et une augmentation du nombre d'anomalies, principalement d'anomalies de la tête (têtes piriformes, vacuoles nucléaires, chromatine anormale (FERNANDES et al., 2008)) et de la queue. Ces modifications des paramètres séminaux ont un impact négatif sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes (FERNANDES et al., 2008) et peuvent persister plusieurs mois. Elles sont consécutives à une hypoxie et à la formation de radicaux libres dans les testicules, expliquées par une augmentation du métabolisme et du besoin en oxygène du parenchyme testiculaire, non couvert par l'apport artériel. Le débit des artères testiculaires est en effet limité par leur longueur et leurs nombreuses circonvolutions (BRITO et al., 2003).

Pendant la phase de sclérodermie, en plus de la modification de la thermorégulation, la présence de kystes dans le parenchyme testiculaire, dans les épидидymes et dans leurs endothéliums est également responsable d'une modification de la spermatogenèse. En effet, comme l'a évoqué KUMI-DIAKA en 1981, les zones non vascularisées deviennent nécrotiques et se fibrosent suite aux lésions endothéliales et à la présence de kystes. Cette fibrose entraîne une pression sur les tubes séminifères et les conduits déférents provoquant leur atrophie.

Les anomalies de l'appareil génital attendues chez les taureaux séropositifs vis-à-vis de la besnoitiose sont donc une sclérodermie et une hyperkératose scrotale, des lésions de fibrose testiculaire, et une modification des paramètres séminaux relatifs aux spermatozoïdes : une baisse de production de spermatozoïdes, une diminution de leur motilité, une augmentation du nombre de morts et une augmentation du nombre d'anomalies, principalement d'anomalies de la tête et de la queue.

Notre étude expérimentale vise alors à évaluer l'impact de la besnoitiose (clinique ou subclinique) sur les paramètres séminologiques.

Partie expérimentale

Cette étude a été réalisée en partenariat par la Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire (FRGDS) PACA, le GDS 04, l'Université de Saragosse et l'ENVT représentée par les unités pédagogiques de Parasitologie et de Pathologie de la reproduction. Elle a visé à évaluer la relation entre l'infection par *Besnoitia besnoiti* et la fonction sexuelle des taureaux ainsi que la possibilité de transmission du parasite par la semence.

I. Matériel et méthodes

1. Locaux

L'ensemble des prélèvements a été réalisé au centre de monte mulassier et équin de Seyne-les-Alpes (04) les 9, 10, 11 et 12 septembre 2013.

Une cage de contention individuelle a permis la réalisation de tous les examens cliniques et de l'ensemble des prélèvements. Entre chaque taureau provenant d'élevages différents, la cage de contention a été nettoyée et désinfectée. De même, entre chaque taureau, le matériel de prélèvement à usage multiple a été nettoyé et désinfecté, à savoir le support rigide et les cônes de récolte du sperme, et les trocards à biopsie concernant les prélèvements cutanés.

2. Animaux

41 taureaux ont participé à l'étude, provenant de 31 élevages différents du canton de Seyne-les-Alpes ou des alentours. La sélection a été réalisée sur la base du volontariat des éleveurs du canton. Les critères d'inclusion des taureaux ont été un âge de plus de 15 mois, c'est-à-dire des animaux pubères, et appartenant à des troupeaux pratiquant la monte naturelle.

L'état général de chaque animal était correct.

Les taureaux ont été transportés par leurs éleveurs au centre de monte à des horaires définis en accord avec le GDS 04. L'emploi du temps prévoyait ainsi trente minutes de manipulation par taureau.

La récolte de semence n'a pas été effectuée chez un taureau Blond d'Aquitaine suite à la demande de son propriétaire. Les résultats relatifs à l'examen de la semence seront donc limités à 40 taureaux.

Ces taureaux étaient de races Charolaise (21 taureaux), Limousine (16 taureaux), Blonde d'Aquitaine (1 taureau), Abondance (1 taureau) et Angus (1 taureau) (Annexe I).

Leur âge était compris entre 1,5 et 8,5 ans, avec une moyenne \pm écart-type de $3,8 \pm 1,9$ ans (Annexe I).

Ils avaient tous une note d'état corporel correcte, comprise entre 2,5 et 4 avec une moyenne \pm écart-type de $3,4 \pm 0,42$ sur une échelle allant de 1 à 5 (Annexe I).

3. Examen des animaux

Dès l'arrivée de chaque taureau à la station, une fiche individuelle d'informations a été remplie comportant les éléments suivants : numéro d'identification à 10 chiffres, race, date de naissance, statut sérologique vis-à-vis de la besnoitiose s'il était connu, antécédents pathologiques du taureau et du troupeau, fertilité sur l'année précédente.

Puis un examen général de chaque taureau a été réalisé : note d'état corporel, recherche de kystes scléaux en lumière rasante, d'épaississement cutané et d'alopécie compatibles avec la besnoitiose clinique.

Un examen de l'appareil génital a également été réalisé : inspection du scrotum, mesure de la circonférence scrotale à l'aide d'un mètre ruban, inspection, palpation et échographie des testicules, des épидидymes (têtes et queues) et du plexus pampiniforme, inspection du fourreau et du pénis, palpation de l'urètre pelvien, de la prostate, des vésicules séminales et des ampoules déférentes et leur échographie en cas d'anomalie perçue lors de la palpation.

Les échographies ont été réalisées avec un appareil Esaote® MyLab One équipé d'une sonde linéaire de 7,5 MHz. La sonde était placée sur les parois latérales du scrotum, longitudinalement en direction du testicule opposé de façon à visualiser le *mediastinum testis* au milieu du parenchyme testiculaire. Puis, en déplaçant la sonde le long des testicules, la tête et la queue des épидидymes et le plexus pampiniforme étaient visualisés.

Les anomalies observées sont récapitulées en annexe IV.

4. Récolte du sperme

La récolte de la semence a été réalisée par électroéjaculation.

Le toupillon de poils du fourreau a été coupé pour des raisons d'hygiène. L'orifice préputial a ensuite été nettoyé et désinfecté grâce à une solution de povidone iodée (Vétédine Savon®, Vétquinol S.A., Lure, France) et d'eau avant d'être rincé et séché. Pendant ce temps, un opérateur massait les vésicules séminales par voie transrectale et vidait le rectum afin d'y introduire la sonde de l'électroéjaculateur (Electrojac5, Ideal Instruments®, MI, USA) préalablement lubrifiée.

Le programme automatique de l'électroéjaculateur a ensuite été utilisé. Celui-ci alterne des phases de stimulation électrique de 2 secondes et des phases de repos de 2 secondes. L'intensité des stimulations augmente à chaque stimulation jusqu'à atteindre l'éjaculation. En cas de manifestations d'inconfort ou de stress pour l'animal, cette intensité pouvait être maintenue constante par l'opérateur. Et malgré cette précaution, si le taureau semblait présenter une douleur ou un stress, les stimulations électriques étaient interrompues.

Après un nombre variable de stimulations électriques, l'éjaculat était récolté dans un tube Falcon® de 15 ml préalablement chauffé à 37°C en essayant, lorsque cela était possible, de séparer dans des tubes différents la fraction pré-spermatique du sperme. Cette seconde portion était repérée par un changement de couleur du liquide qui devenait plus blanc et plus trouble.

Puis l'ensemble de l'éjaculat était immédiatement stocké dans un bain-marie à 37°C avant d'être examiné dans les minutes suivant la récolte.

La récolte de la semence a été infructueuse pour quatre taureaux.

5. Paramètres séminologiques

Le volume (en millilitres) de chaque éjaculat a été déterminé directement sur les graduations du tube de récolte. La couleur (incolore, blanchâtre ou jaunâtre) et la consistance (aqueuse, laiteuse ou crémeuse) ont également été notées. Puis la concentration en spermatozoïdes (en milliard/ml) a été estimée par spectrophotométrie (Accuread®, IMV technologies, L'Aigle, France). Le nombre de spermatozoïdes dans chaque éjaculat a ensuite été calculé à partir de la

concentration en spermatozoïdes mesurée dans le tube contenant la fraction spermatique, et du volume de sperme dans le tube.

Après cela, la motilité massale a été évaluée par l'observation au microscope à platine chauffante (grossissements x100) d'une goutte de semence (5 mm de diamètre, c'est-à-dire environ 6 µl) déposée à la surface d'une lame préalablement chauffée à 37°C. Puis la motilité individuelle a également été appréciée par l'observation d'une goutte de semence (diluée au 20^{ème} (BioXCell®, IMV Technologies, L'Aigle, France) en cas de concentrations en spermatozoïdes trop élevées pour permettre leur observation individuelle) entre lame et lamelle au microscope à platine chauffante (grossissement x400). Ces deux paramètres ont été évalués par deux opérateurs s'étant réparti les éjaculats.

Des étalements de sperme ont été colorés à l'aide d'éosine-nigrosine (Sperm VitalStain®, Nidacon, Gothenburg, Suède) et les lames ont été lutées à l'aide d'une résine (Histolaque LMR®, Labomoderne, Paris, France) afin de déterminer la proportion de spermatozoïdes vivants et morts, ainsi que la proportion de différentes anomalies de queues, de pièces intermédiaires et de têtes : 100 à 200 spermatozoïdes ont été comptés sur chaque lame. La lecture de chacune de ces lames a été réalisée par deux opérateurs différents (Docteur Patricia RONSIN et Adeline DECAUDIN) dans les mois qui ont suivi la récolte.

Enfin, un test de Schalm (Leucocyttest®, Synbiotics Corporation, Kansas City, USA) a été effectué en mélangeant dans une coupelle d'environ 3 cm de diamètre 0,5 ml de sperme et 1 ml de Leucocyttest® pour chaque tube de semence afin de mettre en évidence une éventuelle inflammation génitale.

Tous ces résultats sont inscrits en annexe IV.

6. Evaluation de la fonction sexuelle

L'importance des lésions génitales a été évaluée en prenant en compte les lésions scrotales (épaississement, abcès, indurations), testiculaires (taille, mobilité, lésions de fibrose et de dégénérescence à l'échographie), et épидидymaires (induration, kyste). En fonction de l'importance de ces lésions, les taureaux ont été regroupés en 3 catégories (Tableau 5). Cette classification s'appuie sur l'impact potentiel des lésions génitales sur la qualité de la semence.

Tableau 5 : Classification des taureaux en fonction des lésions génitales

Groupe	Lésions présentes sur le scrotum	Lésions présentes sur les testicules	Lésions présentes sur les épидидymes
Absence de lésion génitale	Aucune ou épaissement cutané localisé et/ou petites verrues	Aucune (Image échographique 4) ou rares lésions de fibrose (Image échographique 5)	Aucune ou induration légère d'une tête épидидymaire
Lésions génitales modérées	Epaississement cutané modéré	Fibrose modérée (Image échographique 6) ou sévère (Image échographique 7) et/ou dégénérescence unilatérale (Image échographique 8)	Kyste épидидymaire unilatéral (Image échographique 9)
Lésions génitales sévères	Epaississement cutané sévère (Photographie 1) et/ou abcès cutané(s) (Photographie 2)	Dégénérescence bilatérale	Kystes épидидymaires bilatéraux

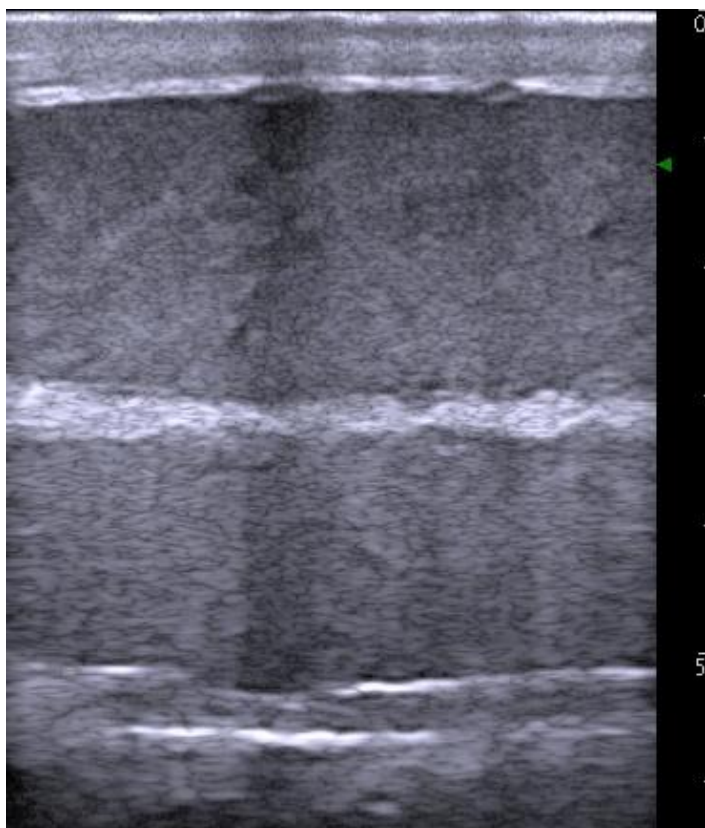


Image échographique 4 : Coupe longitudinale de testicule de taureau sain

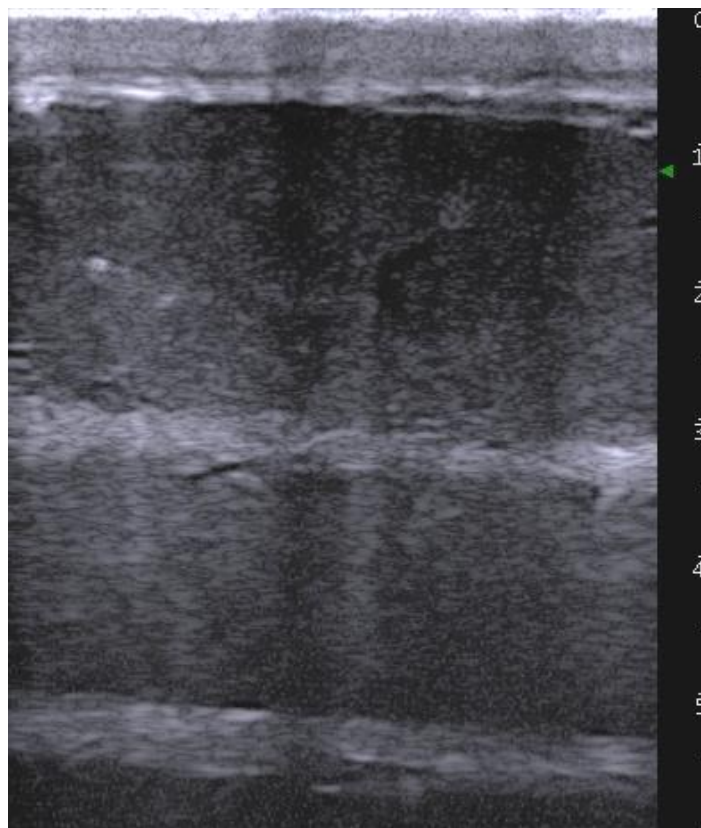


Image échographique 5 : Coupe longitudinale de testicule de taureau atteint de rares lésions de fibrose

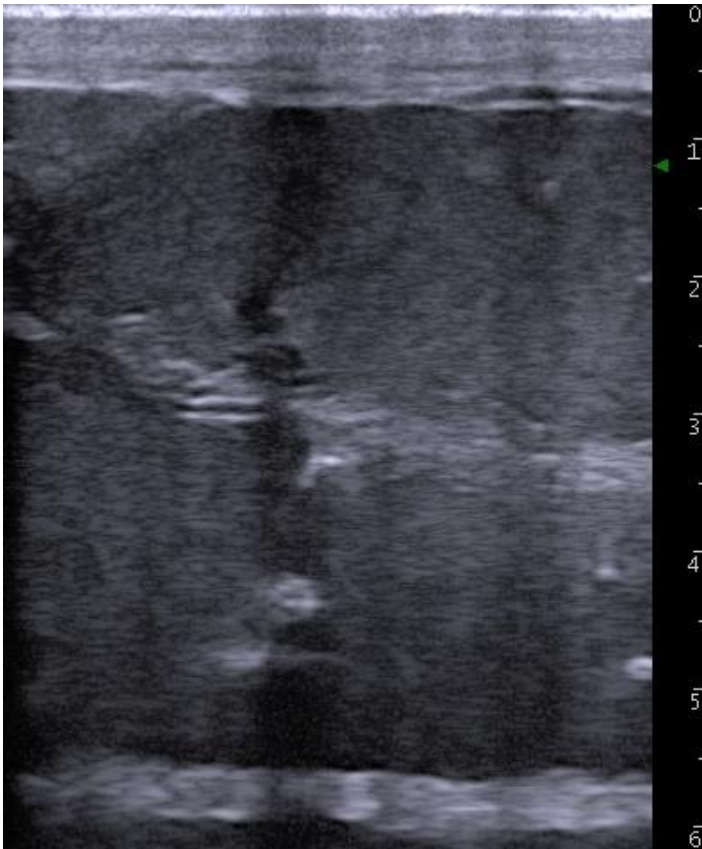


Image échographique 6 : Coupe longitudinale de testicule de taureau atteint de lésions de fibrose modérées

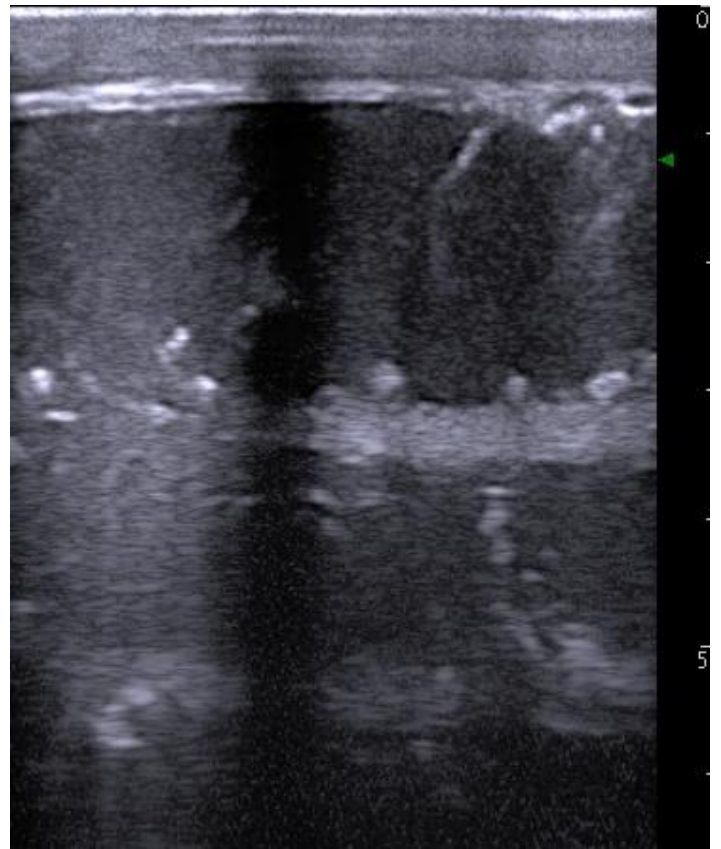


Image échographique 7 : Coupe longitudinale de testicule de taureau atteint de lésions de fibrose sévères

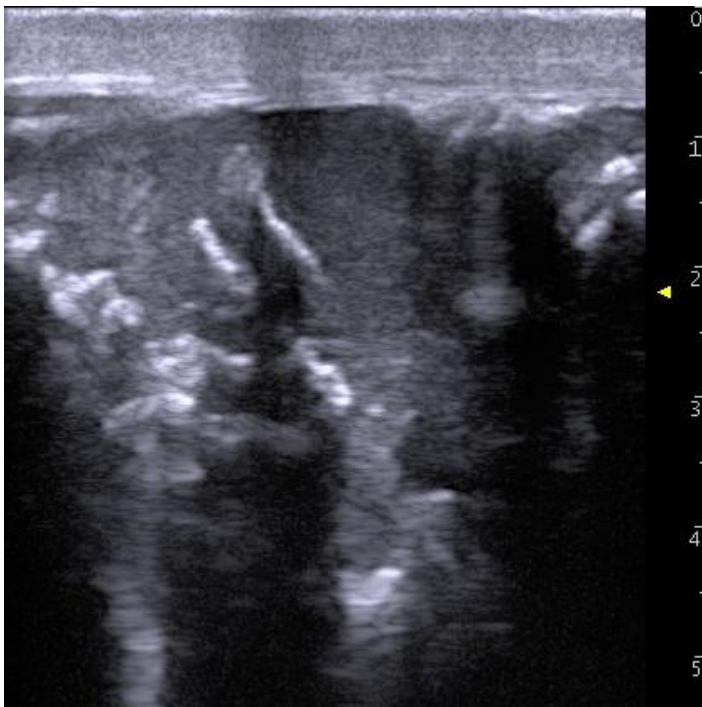


Image échographique 8 : Coupe longitudinale de testicule de taureau atteint d'une dégénérescence testiculaire

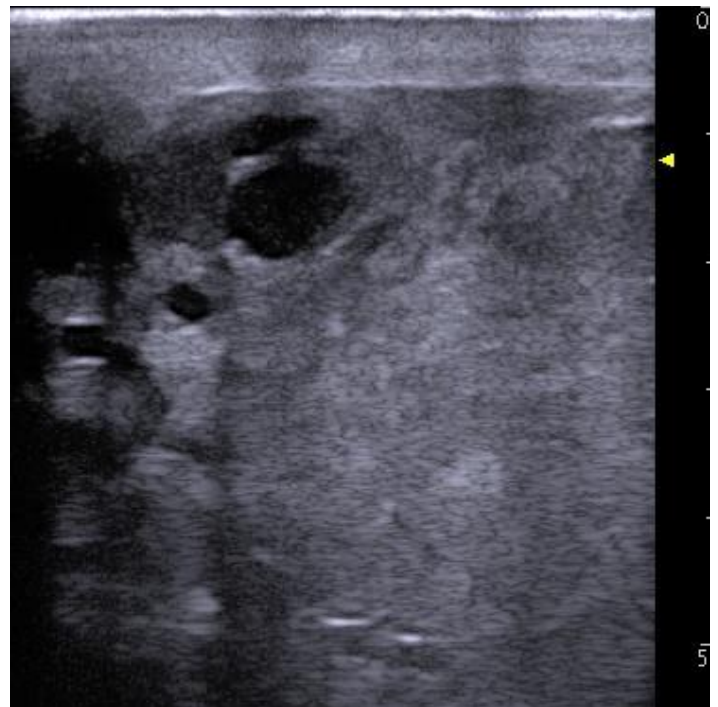


Image échographique 9 : Tête épидидymaire de taureau présentant des structures kystiques



Photographie 1 : Face craniale de scrotum de taureau présentant de multiples abcès



Photographie 2 : Face caudale de scrotum de taureau présentant une hyperkératose sévère

Un score fondé sur les paramètres séminologiques a également été déterminé. Il prend en compte le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat, la motilité individuelle et le pourcentage de spermatozoïdes anormaux (PETER, 2007 ; HOPKINS, SPITZER, 1997) (Tableau 6).

Tableau 6 : Grille de calcul du score séminologique

Note	1	4	7
Nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat (en milliards)	< 1	[1 ; 2[≥ 2
Motilité individuelle	< 40 %	[40 ; 60[%	≥ 60 %
Spermatozoïdes normaux	< 60 %	[60 ; 80[%	≥ 80 %
Score séminologique	3 - 9	12 - 15	18 - 21
Qualité de la semence	Mauvaise	Moyenne	Bonne

7. Sérologie (ELISA, Western-Blot)

Trois méthodes d'analyse sérologique ont été utilisées pour détecter les anticorps spécifiques de la besnoitiose : deux tests ELISA et un test Western-Blot. Pour obtenir le sérum de chaque taureau, du sang a été prélevé par ponction de la veine caudale dans des tubes vacutainers (Venosafe® Plastic Tube: Serum gel -VF-054SAS02) qui permettent l'obtention rapide du sérum. Ce sérum a été prélevé et aliquoté puis tous les échantillons ont été stockés à -20°C jusqu'à leur analyse.

a. Tests ELISA

Les tests ELISA indirects utilisés pour cette étude ont été réalisés par le Laboratoire Vétérinaire Départemental de l'Ariège (LVD 09) selon les recommandations du fabricant. Les résultats sont obtenus en mesurant l'intensité de la coloration produite en présence d'anticorps anti-*Besnoitia besnoiti* et en établissant le rapport des intensités de coloration des échantillons sur celles des témoins positifs.

Pour le kit Screen Besnoitia Indirect® (IDVet, Grabels, France), possédant une sensibilité de 97 % et une spécificité proche de 100 % (GARCIA-LUNAR et al., 2013), si le rapport de l'intensité de coloration de l'échantillon sur celle des témoins positifs est inférieur ou égal à 60 %, le résultat est considéré « négatif ». S'il est supérieur ou égal à 70 %, le résultat est considéré « positif », et s'il est entre 60 et 70 %, le résultat est considéré « douteux ».

Pour le kit PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0 (Prionics, Schlieren, Suisse), possédant une sensibilité proche de 100 % et une spécificité de 98 % (GARCIA-LUNAR et al., 2013), si ce rapport est inférieur à 15 %, le résultat est considéré « négatif » alors que s'il est supérieur ou égal à 15 %, le résultat est considéré « positif ».

Tableau 7 : Interprétation des tests ELISA en fonction du pourcentage de réaction mesuré

Kit Screen Besnoitia Indirect®			
Pourcentage de réaction	≤ 60 %	> 60 % et < 70 %	≥ 70 %
Résultat	Négatif	Douteux	Positif
Kit PrioCHECK® Besnoitia AB 2.0			
Pourcentage de réaction	< 15 %	≥ 15 %	
Résultat	Négatif	Positif	

b. Western-Blot (LIENARD et al., 2011)

Les analyses sérologiques ont également été faites par Western-Blot, selon le protocole décrit par LIENARD en 2011. Même si son prix est plus élevé (20 euros par analyse contre 6 à 8 euros pour un test ELISA) et sa réalisation plus longue, ce test est la méthode de référence dans le diagnostic sérologique de la besnoitiose (GARCIA-LUNAR et al., 2013).

Pour le réaliser, des tachyzoïtes sont récoltés à partir d'une culture sur cellules Vero infectées. Ils subissent une filtration sur gel grâce à une colonne Sephadex® G-25 (GE Healthcare Europe GmbH, Orsay, France) et sont centrifugés à 1200 G pendant 10 minutes à 4°C. Le culot obtenu est dénaturé par un chauffage à 95°C pendant 10 minutes puis solubilisé. Il subit une première électrophorèse sur un gel SDS-PAGE permettant de séparer les différents antigènes de *Besnoitia besnoiti*. Dans le premier puits du gel sont placés des marqueurs de poids moléculaires connus (Protein Dual Color Standards®, Biorad, Marne la Coquette, France), et dans les autres puits la solution contenant les antigènes du parasite.

Ensuite, une seconde électrophorèse permet de transférer les marqueurs et les antigènes sur une membrane PDVF (Immun-Blot® PVDF Membrane for Protein Blotting, Biorad, Marne la Coquette, France). Le sérum des bovins à tester est ajouté sur la membrane. Après une incubation de 60 minutes à 37°C, la plaque est lavée avec du PBS+Tween 20 afin d'éliminer les anticorps non liés aux antigènes, et des anticorps anti-IgG bovins conjugués à une peroxydase (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) sont ajoutés. Un deuxième lavage est réalisé pour chasser ces nouveaux anticorps non fixés et le substrat de coloration est ajouté (Opti 4CN

Substrate kit®, Biorad, Marne la Coquette, France). Après 30 minutes d'incubation, la lecture est effectuée : un taureau est considéré séropositif lorsque les trois domaines antigéniques principaux (domaine 1 : antigènes entre 12 et 20 kDa ; domaine 2 : antigènes entre 23 et 38 kDa ; domaine 3 : antigènes entre 60 et 90 kDa) ont réagi avec le sérum. Et pour chaque domaine, il y a réaction lorsqu'au moins quatre bandes sont apparues.

Avec ce protocole, la sensibilité est de 91 % et la spécificité de 96 à 100 % (comparativement à une recherche histologique du parasite associée à un test IFAT) (CORTES et al., 2006).

8. qPCR

La recherche de l'ADN du parasite a été effectuée par PCR en temps réel à partir de biopsies cutanées, de sang, de liquide pré-spermatique et de sperme.

Les biopsies cutanées ont été réalisées à l'aide d'un trocard à biopsie (Biopsy Punch® 8 mm, Kruuse, Langeskov, Danemark) à droite de la région périanale de chaque taureau. En effet, cette région est facile d'accès et révèle un taux de faux négatifs plus faible que d'autres localisations comme le cou ou les oreilles (LIENARD, 2012).

Tous les échantillons ont été stockés à -20°C jusqu'à leur analyse.

L'extraction de l'ADN a été réalisée par l'intermédiaire du kit QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant. Puis la PCR en temps réel a été effectuée grâce au kit AdiaVet® *Besnoitia* (AES Chemunex, Bruz, France). Les amorces employées sont spécifiques à *Besnoitia besnoiti*. Des témoins négatifs (eau pure) et positifs (ADN du parasite fourni dans le kit) ont été utilisés.

De plus, afin de déterminer la sensibilité de cette technique, des quantités connues d'ADN de tachyzoïtes, correspondant à l'ADN de 250, 25, 2,5, 0,25 et 0,025 tachyzoïtes, ont été mélangées à du sperme de taureau sain et soumises à la réaction.

Les qPCR ont été effectuées avec un appareil Stratagene® MX3005P (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA), et les résultats fournis ont été analysés à l'aide du logiciel MxPro® QPRC version 4.10 software (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA).

Les Ct-values supérieures ou égales à 40 ont été considérées comme négatives.

9. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type et étendue. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XLStat®. Le seuil de 5 % ($p \leq 0,05$) a été retenu comme significatif.

Pour chaque paramètre, les groupes de taureaux comparés ont été :

- taureaux séronégatifs, taureaux séropositifs sans signe clinique, taureaux séropositifs avec signes cliniques d'une part ;
- taureaux sans lésion génitale, taureaux avec lésions génitales modérées, taureaux avec lésions génitales sévères d'autre part.

Un test de χ^2 a été utilisé pour comparer entre les groupes les proportions de taureaux ayant des résultats de qPCR positifs ou négatifs et les résultats du test de Schalm.

Un test exact de Fisher a été utilisé pour comparer entre les groupes les résultats concernant les lésions génitales, la concentration en spermatozoïdes des éjaculats, leur motilité massale et leur score séminologique. En cas de comparaisons multiples, une correction de Bonferroni a été réalisée.

Un test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer entre les groupes les Ct-values des qPCR, le nombre de stimulations électriques nécessaires à l'électroéjaculation, le volume des éjaculats, leur concentration en spermatozoïdes, la quantité de spermatozoïdes par éjaculat, les motilités massales et individuelles, les taux de mortalité et d'anomalies des spermatozoïdes, les âges et les circonférences scrotales. Un test de Mann-Whitney a permis de décrire quel groupe se différencie des autres après le test de Kruskal-Wallis.

Un test de corrélation de Spearman a été réalisé pour évaluer la relation entre la concentration en spermatozoïdes et la motilité massale des éjaculats.

Une régression logistique a été utilisée pour comparer la présence de lésions génitales entre les groupes de taureaux.

II. Résultats et discussion

1. Sérologie vis-à-vis de *Besnoitia besnoiti*

La présence d'anticorps anti-*Besnoitia besnoiti* a été observée dans les sérums de 29/40 (72,5 %) taureaux par Western-Blot, de 32/40 (80 %) taureaux par le test ELISA Prionics® et de 28/40 (70 %) taureaux par le test ELISA IDVet® (Annexe II). Le sérum d'un taureau est apparu comme « douteux » par le test ELISA IDVet®. Les résultats des deux autres tests pour ce sérum étant positifs, ce résultat « douteux » a été considéré comme « positif ».

Ainsi, les résultats sérologiques ont été semblables entre les tests Western-Blot et ELISA IDVet®.

Les 3 taureaux « positifs » avec le test ELISA Prionics® mais apparus « négatifs » par les deux autres tests ont été considérés comme faux positifs. En effet, comme décrit précédemment, la technique de référence est le Western-Blot. De plus, de fait sa spécificité plus faible, le test ELISA Prionics® admet une valeur prédictive positive moins élevée, ce qui pourrait expliquer ces différences.

En définitive, parmi les 40 taureaux testés, 11 ont été considérés comme séronégatifs et 29 comme séropositifs dans la suite de l'étude.

2. Signes cliniques de besnoitiose

12 taureaux présentaient des signes de besnoitiose : 3 présentaient uniquement des kystes scléaux, 4 uniquement une hyperkératose cutanée, et 5 des kystes scléaux associés à une hyperkératose. Cependant, il faut noter qu'aucun animal ne souffrait d'une phase aiguë de besnoitiose. Les taureaux atteints cliniquement n'en présentaient que des signes frustes qui n'altéraient pas leur état général.

En tenant compte des résultats de la sérologie et de l'examen clinique, les taureaux ont été classés en trois catégories : les taureaux séronégatifs (11 taureaux), les taureaux séropositifs sans signe clinique (17 taureaux, dont 16 pour lesquels un éjaculat a été obtenu) et les taureaux séropositifs avec signes cliniques (12 taureaux, dont 9 pour lesquels un éjaculat a été obtenu). Ces trois groupes ont été comparés pour chaque paramètre étudié.

3. Recherche du parasite par qPCR

L'ADN de *Besnoitia besnoiti* a été mis en évidence dans le sang de 2 taureaux (Ct-values de 32,85 et 39,61). Ces deux taureaux étaient séropositifs sans signe clinique, et l'ADN du parasite a également été retrouvé dans leurs échantillons cutanés (Ct-values de 24,34 et 32,41). 18 autres taureaux ont réagi positivement à la qPCR sur biopsie cutanée (Ct-values comprises entre 16,64 et 39,67) (Annexe II).

Parmi les 20 taureaux ayant une qPCR cutanée positive, 7 appartiennent au groupe des taureaux séropositifs avec signes cliniques, 10 au groupe des séropositifs sans signe clinique et 3 au groupe des séronégatifs.

La présence d'ADN du parasite dans la peau de 3 taureaux séronégatifs rejoint les observations de SCHARES en 2010 qui avait observé des taureaux cliniquement atteints mais séronégatifs.

Une explication possible pour ces 3 taureaux serait la présence de faux positifs liés à la spécificité imparfaite de la qPCR, ou encore une infestation trop précoce pour une réponse sérologique positive. Cependant, ce ne sont que des hypothèses, aucune explication n'est actuellement validée pour expliquer cette absence de réponse immunitaire détectable.

Tableau 8 : Résultats de la qPCR sur biopsie cutanée chez les 40 taureaux en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose (11 séronégatifs, 17 séropositifs sans signe clinique et 12 séropositifs avec signes cliniques)

	Séronégatifs (n=11)	Séropositifs sans signe clinique (n=17)	Séropositifs avec signes cliniques (n=12)
Nombre de qPCR +	3 a	(10	b 7)
Proportion de qPCR +	27 %	59 %	58 %
Ct-value moyenne ± écart-type	36,83 ± 2,46 a	32,94 ± 5,78 a	24,19 ± 5,50 b
Médiane	35,61	35,05	23,89
Etendue	[35,22 ; 39,67]	[23,53 ; 38,63]	[16,64 ; 33,31]

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$ pour la ligne Ct-value moyenne) ou tendant à être significativement différentes ($p \leq 0,1$ pour la ligne Nombre de qPCR +).

La différence de proportion de qPCR positives entre les taureaux séronégatifs (3/11 ; 27 %) et séropositifs (17/29 ; 59 %) tend à être significative ($p=0,077$, test de Khi^2) (Tableau 8).

Les Ct-values des taureaux qPCR-positifs étaient quant à elles significativement différentes entre les trois groupes de taureaux ($p=0,010$, Kruskal-Wallis) (Tableau 8) : chez les séropositifs avec signes cliniques, la Ct-value moyenne était de $24,19 \pm 5,50$ (valeurs allant de 16,64 à 33,31), plus faible que chez les séronégatifs pour lesquels elle était de $36,83 \pm 2,46$ (valeurs allant de 35,22 à 39,67) et chez les séropositifs sans signe clinique chez qui elle était de $32,94 \pm 5,78$ (valeurs allant de 23,53 à 38,83).

Ainsi, chez les taureaux présentant des signes cliniques de besnoitiose, la quantité de parasites dans la peau était supérieure à celle retrouvée chez les taureaux non atteints cliniquement. Cette observation soutient l'hypothèse d'un nombre plus important de kystes dans la peau des animaux malades, et conforte l'hypothèse d'une richesse en kystes plus grande également dans les tissus génitaux de ces animaux. Cela augmenterait le risque de lésions génitales chez les animaux malades par rapport aux animaux séropositifs sans signe clinique.

La recherche de l'ADN de *Besnoitia besnoiti* a été réalisée dans du sperme contenant la quantité d'ADN correspondant à 250, 25, 2,5, 0,25 et 0,025 parasite(s) comme décrit précédemment. Les Ct-values obtenues étaient respectivement de 30,33, 32,73, 37,47, no-Ct et no-Ct. La limite de détection du test a donc été estimée à environ 2,5 parasites par réaction.

La qPCR a ensuite été conduite sur la fraction pré-spermatique de 26 taureaux (7 taureaux séronégatifs, 9 taureaux séropositifs sans signe clinique et 10 taureaux séropositifs avec signes cliniques) et le sperme de 28 taureaux (8 taureaux séronégatifs, 16 taureaux séropositifs sans signe clinique et 4 taureaux séropositifs avec signes cliniques), récoltés par électroéjaculation, lorsque la quantité était suffisante après les analyses séminologiques. Ces échantillons provenaient des 40 taureaux, c'est-à-dire de 11 taureaux séronégatifs, 17 taureaux séropositifs sans signe clinique et 12 taureaux séropositifs avec signes cliniques. La présence de l'ADN du parasite n'a pas été mise en évidence, suggérant que le sperme n'est probablement pas une source de transmission de *Besnoitia besnoiti*.

4. Lésions de l'appareil génital

Les lésions de l'appareil génital sont décrites individuellement dans l'annexe III et le Tableau 9. Dans ce tableau, en cas d'observation de plusieurs lésions sur un même animal, seule la lésion la plus sévère a été indiquée.

Tableau 9 : Lésions de l'appareil génital observées chez 40 taureaux

		Tous les taureaux (n=40)			
Localisation	Lésion	Nombre de taureaux		Proportion	
	Absence	12		30 %	
Testicule	Fibrose légère	8		20 %	
	Fibrose modérée	5		13 %	
	Fibrose sévère	3		8 %	
	Dégénérescence	1		3 %	
Epididyme	Induration	1		3 %	
	Kyste	2		5 %	
Scrotum	Abcès	1		3 %	
	Hyperkératose	7		18 %	
Ensemble des lésions totales de l'appareil génital (excepté les lésions de fibrose légère)		20		50 %	

Localisation	Lésion	Séronégatifs (n=11)		Séropositifs sans signe clinique (n=17)		Séropositifs avec signes cliniques (n=12)	
		Nombre	Proportion	Nombre	Proportion	Nombre	Proportion
	Absence	6	55 %	6	38 %	0	0 %
Testicule	Fibrose légère	3	27 %	4	25 %	1	8 %
	Fibrose modérée	0	0 %	3	18 %	2	17 %
	Fibrose sévère	0	0 %	3	18 %	0	0 %
	Dégénérescence	0	0 %	0	0 %	1	8 %
Epididyme	Induration	0	0 %	1	6 %	0	0 %
	Kyste	2	18 %	0	0 %	0	0 %
Scrotum	Abcès	0	0 %	0	0 %	1	8 %
	Hyperkératose	0	0 %	0	0 %	7	58 %
Ensemble des lésions totales de l'appareil génital (excepté les lésions de fibrose légère)		2	18 %	7	41 %	11	92 %

La lésion la plus fréquemment observée a été une fibrose testiculaire légère, visible seulement à l'échographie. Cette lésion très répandue est sans conséquence physiopathologique et n'a pas été prise en compte par la suite. En effet, étant isolée et limitée à une faible part du parenchyme testiculaire, elle n'a pas de répercussion sur la qualité de la semence (BARTH et al., 2008).

La deuxième lésion fréquemment observée a été une hyperkératose du scrotum. Elle n'a été observée que chez les taureaux séropositifs avec signes cliniques, et concerne dans ce groupe plus de la moitié des individus, ce qui est en accord avec les symptômes de la besnoitiose.

Chez les taureaux séronégatifs, mis à part quelques lésions de fibrose testiculaire légère, les seules anomalies observées ont été des kystes épидидymaires, unilatéral chez un individu et bilatéraux chez un autre. Aucun autre kyste n'a été observé, en particulier chez les séropositifs.

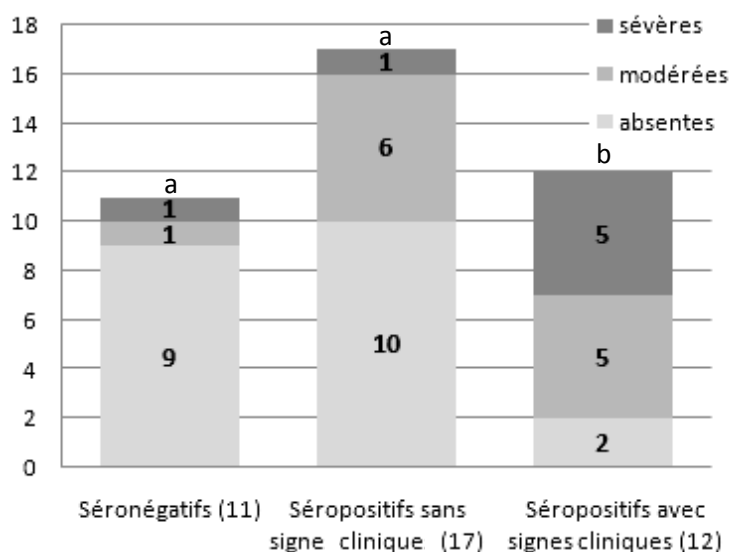
Ainsi, 21 taureaux ne présentaient pas de lésion de l'appareil génital (ou seulement une fibrose testiculaire légère) : 9/11 (82 %) séronégatifs, 10/17 (59 %) séropositifs sans signe clinique et 2/12 (17 %) séropositifs avec signes cliniques.

12 taureaux portaient des lésions génitales modérées (décrites dans le Tableau 5) : 1/11 (9 %) séronégatif, 6/17 (35 %) séropositifs sans signe clinique et 5/12 (42 %) séropositifs avec signes cliniques.

Enfin, 7 taureaux présentaient des lésions génitales sévères : 1/11 (9 %) séronégatifs, 1/17 (6 %) séropositifs sans signe clinique et 5/12 (42 %) séropositifs avec signes cliniques (Graphique 1).

La fréquence de lésions génitales modérées à sévères était significativement plus élevée ($p=0,005$, régression logistique) chez les taureaux séropositifs avec signes cliniques que chez les autres taureaux (Graphique 1).

**Nombre de taureaux affectés par des lésions génitales
absentes, modérées ou sévères**



Deux lettres différentes (a, b) indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$).

Graphique 1 : Répartition des taureaux en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales pour les 3 groupes de taureaux (séronégatifs, séropositifs sans signe clinique et séropositifs avec signes cliniques)

De plus, les lésions de fibrose testiculaire modérées à sévères étaient significativement plus fréquentes ($p=0,037$, test exact de Fisher) chez les taureaux séropositifs que chez les séronégatifs.

Ce résultat est en accord avec les attentes formulées plus haut, à savoir une prévalence d'hyperkératose scrotale et de fibrose testiculaire plus fortes chez les animaux infestés de kystes.

Cependant, les taureaux séropositifs sans signe clinique ne présentaient pas plus de lésions génitales totales que les taureaux séronégatifs. Deux explications sont possibles :

- La première est une absence d'hyperkératose scrotale chez les taureaux sans signe clinique de besnoitiose. En effet, ce symptôme est un des critères d'inclusion dans le groupe des taureaux séropositifs avec signes cliniques, il est donc absent de l'autre groupe et peut expliquer le nombre plus faible de lésions génitales.
- La deuxième explication est le faible effectif dans chaque groupe de taureaux, qui est responsable d'une puissance de test probablement insuffisante pour mettre en évidence une potentielle différence de prévalence de lésions génitales entre les taureaux séronégatifs et les taureaux séropositifs sans signe clinique.

5. Qualité du sperme

La récolte de la semence a échoué chez 4 taureaux : la qualité du sperme n'a été déterminée que chez les 36 taureaux récoltés. Elle prend en compte le volume de l'éjaculat, sa couleur, sa consistance, sa concentration en spermatozoïdes, le résultat du test de Schalm, les motilités massale et individuelle, et les taux de mortalité et d'anomalies des spermatozoïdes.

Le nombre de stimulations électriques nécessaires à l'électroéjaculation a été mesuré chez 32 taureaux. Chez les 4 autres animaux, ce paramètre n'a pas été renseigné.

Il a varié entre 3 et 57 selon les taureaux, avec une moyenne \pm écart-type de $22,66 \pm 13,16$ (Tableau 10).

Tableau 10 : Nombre de stimulations nécessaires à l'éjaculation de 32 taureaux en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose

	Tous les taureaux (n=32)	Séronégatifs (n=9)	Séropositifs sans signe clinique (n=15)	Séropositifs avec signes cliniques (n=9)
Moyenne \pm écart-type	22,66 \pm 13,16	15,63 \pm 13,33	a 22,40 \pm 11,21	b 29,33 \pm 14,00
Médiane	19,00	11,50	18,00	26,00
Etendue	[3 ; 57]	[3 ; 42]	[12 ; 51]	[13 ; 57]
Nombre de taureaux sans collecte d'éjaculat	4	0	1	3

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$).

Le nombre de stimulations nécessaires pour obtenir un éjaculat a été significativement plus élevé chez les taureaux séropositifs comparativement aux taureaux séronégatifs ($p=0,039$, Kruskal-Wallis).

Tableau 11 : Nombre de stimulations électriques nécessaires à l'éjaculation de 32 taureaux en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales

	Tous les taureaux (n=32)	Sans lésion génitale (n=18)	Lésions génitales modérées (n=10)	Lésions génitales sévères (n=4)
Moyenne ± écart-type	22,66 ± 13,16	20,44 ± 13,27 a	22,10 ± 10,56 a	34,00 ± 15,98 a
Médiane	19,00	16,50	19,00	29,50
Etendue	[3 ; 57]	[3 ; 51]	[13 ; 46]	[20 ; 57]
Nombre de taureaux sans collecte d'éjaculat	4	1 (6 %)	1 (10 %)	2 (50 %)

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$).

En comparant cette fois les nombres de stimulations électriques nécessaires pour obtenir un éjaculat en fonction des différents scores cliniques des taureaux (Tableau 11), il n'apparaît pas de différence significative entre les taureaux sans lésion génitale et ceux en présentant.

Par contre, les 4 taureaux dont la collecte a échoué étaient séropositifs vis-à-vis de la brucellose, et 2 d'entre eux présentaient des lésions génitales sévères. Donc, même si les échecs de récolte de semence sont susceptibles d'affecter les taureaux sains, les résultats précédents évoquent une électroéjaculation moins efficace chez les taureaux séropositifs.

Une explication possible est qu'un critère retenu pour affirmer l'éjaculation était la présence de spermatozoïdes dans le liquide récupéré. En l'absence de nombreux spermatozoïdes visibles au microscope, l'échantillon était considéré comme du liquide pré-spermatique. Or, chez les taureaux séropositifs, la production de spermatozoïdes peut être altérée par la présence de kystes dans les testicules. Ainsi, même en cas d'éjaculation, c'est-à-dire d'émission de liquide d'origine testiculaire/épididymaire, la quantité de spermatozoïdes pourrait rester faible dans l'échantillon récolté. Pour vérifier l'origine du liquide spermatique récolté, des marqueurs physiologiques de l'éjaculation auraient pu être dosés dans la semence, tel que la carnitine ou la phosphatase alcaline comme cela est réalisé chez l'homme (SAEED et al., 1994) ou le chien (MEMON, 2007).

Une des possibilités pour améliorer la qualité des éjaculats aurait été de procéder à une injection d'ocytocine quelques minutes avant la récolte (BERNDTSON, IGBOELI, 1988). En effet, cette hormone provoque des contractions des muscles lisses entourant la queue de l'épididyme et les canaux déférents, permettant le transport des spermatozoïdes vers l'urètre. Celle-ci est sécrétée par l'hypophyse pendant la préparation sexuelle des taureaux (RIGAL, 2008), étape non réalisée lors d'une récolte par électroéjaculation. Cependant, l'efficacité d'une administration d'ocytocine est à discuter dans ce contexte. En effet, le stress du transport des taureaux jusqu'au lieu de collecte et leur manipulation a certainement été à l'origine d'une décharge d'adrénaline, molécule perturbant l'arrivée de l'ocytocine hypophysaire ou administrée jusqu'à l'appareil génital.

a. Volume de l'éjaculat

Le volume de la fraction pré-spermatique, qui correspond au volume récolté mais dans lequel aucun spermatozoïde n'a été mis en évidence, n'a pas été analysé, ce qui exclut les 4 taureaux n'ayant pas éjaculé.

En moyenne, le volume des éjaculats est de $7 \pm 5,30$ ml, allant de 1,5 ml à 30,50 ml (Tableau 12).

Tableau 12 : Volumes des éjaculats (en ml) des 36 taureaux prélevés par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose

	Tous les taureaux (n=36)	Séronégatifs (n=11)	Séropositifs sans signe clinique (n=16)	Séropositifs avec signes cliniques (n=9)
Moyenne \pm écart-type	7,00 \pm 5,30	6,91 \pm 2,10 a	6,38 \pm 4,36 a	8,22 \pm 8,90 a
Médiane	6	7	5,75	5
Etendue	[1,5; 30,5]	[4 ; 11]	[1,5 ; 15]	[2 ; 30,5]

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$).

Le volume moyen de l'éjaculat était de $6,91 \pm 2,10$ ml chez les taureaux séronégatifs, de $6,38 \pm 4,36$ ml chez les taureaux séropositifs sans signe clinique, et de $8,22 \pm 8,90$ ml chez les taureaux séropositifs avec signes cliniques.

Tableau 13 : Volumes des éjaculats (en ml) des 36 taureaux prélevés par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales

	Tous les taureaux (n=36)	Sans lésion génitale (n=20)	Lésions génitales modérées (n=11)	Lésions génitales sévères (n=5)
Moyenne ± écart-type	7,00 ± 5,30	7,38 ± 6,19 ^a	7,36 ± 4,09 ^a	4,70 ± 3,80 ^a
Médiane	6,00	5,75	8,00	4,00
Etendue	[1,5 ; 30,5]	[2 ; 30,5]	[2 ; 14]	[1,5 ; 11]

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$).

Les volumes moyens ± écarts-types des éjaculats obtenus étaient de $7,38 \pm 6,19$ ml chez les taureaux ne présentant pas de lésion génitale, de $7,36 \pm 4,09$ ml chez ceux présentant des lésions génitales modérées, et de $4,70 \pm 3,80$ ml chez ceux présentant des lésions génitales sévères (Tableau 13).

La séropositivité et la présence de lésions génitales ou leur sévérité n'a pas affecté le volume des éjaculats.

Ce résultat peut être expliqué par le fait que le sperme est majoritairement composé de plasma séminal. Or, comme précisé précédemment, le plasma séminal est principalement sécrété par les glandes annexes, en particulier les vésicules séminales, organes qui ne semblent pas affectés par *Besnoitia besnoiti* (KUMI-DIAKA et al., 1981) ni par les lésions génitales recherchées dans l'étude.

b. Concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat

La concentration moyenne en spermatozoïdes des 36 éjaculats recueillis était de 278 ± 385 millions/ml, ce qui correspond à la limite basse attendue chez des taureaux en monte naturelle. Cependant, la récolte ayant été réalisée par électroéjaculation, les valeurs usuelles sont à revoir à la baisse. A titre d'exemple, RIGAL (2008) a obtenu des éjaculats en moyenne 2,5 fois moins concentrés en spermatozoïdes par électroéjaculation que par récolte au vagin artificiel.

La concentration en spermatozoïdes a été inférieure au seuil de détection du spectrophotomètre (< 1 million/ml) chez un animal parmi les 36. Pour les calculs, la concentration a été arbitrairement fixée à 1 million/ml chez ce taureau appartenant au groupe des séropositifs avec signes cliniques.

Les éjaculats des taureaux séronégatifs ont eu une concentration moyenne \pm écart-type de 385 ± 462 millions/ml et ceux des taureaux séropositifs sans signe clinique de 317 ± 257 millions/ml (Tableau 14).

Les éjaculats des taureaux séropositifs avec signes cliniques ont eu une concentration moyenne plus faible ($p=0,018$, Kruskal-Wallis) de 79 ± 86 millions/ml.

Tableau 14 : Concentrations en spermatozoïdes (en milliard/ml) des éjaculats des 36 taureaux prélevés par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose

	Tous les taureaux (n=36)	Séronégatifs (n=11)	Séropositifs sans signe clinique (n=16)	Séropositifs avec signes cliniques (n=9)
Moyenne \pm écart-type	0,278 \pm 0,325	0,385 \pm 0,462 a	0,317 \pm 0,257 a	0,079 \pm 0,086 b
Médiane	0,116	0,115	0,227	0,052
Etendue	[0,001 ; 1,32]	[0,033 ; 1,32]	[0,02 ; 0,85]	[0,001 ; 0,285]

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$).

Ainsi, les taureaux présentant des signes cliniques de besnoitiose ont eu un éjaculat moins concentré en spermatozoïdes que les taureaux sans signe clinique, qu'ils soient séropositifs ou séronégatifs.

Tableau 15 : Concentrations en spermatozoïdes (en milliard/ml) des éjaculats des 36 taureaux prélevés par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales

	Tous les taureaux (n=36)	Sans lésion génitale (n=20)	Lésions génitales modérées (n=11)	Lésions génitales sévères (n=5)
Moyenne \pm écart-type	0,278 \pm 0,325	0,397 \pm 0,371 a	0,163 \pm 0,194 b	0,055 \pm 0,066 b
Médiane	0,116	0,289	0,080	0,040
Etendue	[0,001 ; 1,320]	[0,020 ; 1,320]	[0,044 ; 0,600]	[0,001 ; 0,164]

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$).

Les taureaux sans lésions génitales ont produit des éjaculats en moyenne plus concentrés en spermatozoïdes que les taureaux avec des lésions génitales modérées ou sévères ($p=0,005$, Kruskal-Wallis) (Tableau 15).

Les éjaculats collectés par électroéjaculation des taureaux séropositifs avec signes cliniques et ceux des taureaux affectés par des lésions génitales ont donc été moins concentrés en spermatozoïdes. Même si l'interprétation s'avère délicate en raison de la technique de récolte par électroéjaculation, ces observations semblent confirmer les hypothèses précédentes, c'est-à-dire une moindre production de spermatozoïdes par le parenchyme testiculaire altéré chez les taureaux malades et chez ceux présentant des lésions génitales.

c. Quantité de spermatozoïdes

La quantité de spermatozoïdes par éjaculat a été calculée en multipliant la concentration en spermatozoïdes par le volume de l'éjaculat. Il s'agit d'un paramètre relativement stable quelle que soit la méthode de collecte (électroéjaculation et vagin artificiel) (FOSTER et al., 1970).

Les quantités de spermatozoïdes par éjaculat ont été comprises entre 27 millions et 9,24 milliards pour 35 taureaux. La quantité de spermatozoïdes de l'éjaculat du taureau dont la concentration était inférieure au seuil de détection de spectrophotomètre a été arbitrairement fixée à 2 millions de spermatozoïdes (éjaculat de 2 ml ayant une concentration fixée à 1 million de spermatozoïdes/ml) pour les analyses.

La quantité moyenne \pm écart-type de spermatozoïdes par éjaculat a été de $1,79 \pm 2,32$ milliard. Elle a été de $2,55 \pm 3,00$ milliards chez les taureaux séronégatifs, de $1,92 \pm 2,25$ milliard chez les taureaux séropositifs sans signe clinique, et tend à être plus faible ($p=0,11$, Kruskal-Wallis), de $0,637 \pm 0,80$ milliard chez les taureaux séropositifs avec signes cliniques (Tableau 16).

Tableau 16 : Quantités de spermatozoïdes (en milliards) par éjaculat collecté sur 36 taureaux par électroéjaculation, en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose

	Tous les taureaux (n=36)	Séronégatifs (n=11)	Séropositifs sans signe clinique (n=16)	Séropositifs avec signes cliniques (n=9)
Moyenne ± écart-type	1,792 ± 2,324	2,551 ± 2,996 a	1,921 ± 2,245 a	0,637 ± 0,795 b
Médiane	0,678	0,715	0,934	0,414
Etendue	[0,002 ; 9,240]	[0,297 ; 9,240]	[0,140 ; 7,000]	[0,002 ; 2,489]

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs tendant à être différentes ($p=0,11$).

La présence de lésions génitales sévères est associée à une quantité plus faible de spermatozoïdes par éjaculat ($p=0,020$, Kruskal-Wallis) (Tableau 17).

Tableau 17 : Quantités en spermatozoïdes (en milliards) dans les éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales

	Tous les taureaux (n=36)	Sans lésion génitale (n=20)	Lésions génitales modérées (n=11)	Lésions génitales sévères (n=5)
Moyenne ± écart-type	1,792 ± 2,324	2,411 ± 2,541 a	1,375 ± 2,107 a	0,238 ± 0,287 b
Médiane	0,678	1,881	0,490	0,200
Etendue	[0,002 ; 9,240]	[0,140 ; 9,240]	[0,160 ; 7,000]	[0,002 ; 0,715]

Deux lettres différentes (a, b) dans une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$).

Ainsi, les taureaux présentant des signes cliniques de besnoitiose ou surtout présentant des lésions génitales sévères produisent des éjaculats contenant moins de spermatozoïdes que les taureaux sains.

Ce résultat va dans le sens des hypothèses évoquées concernant les différences de volume et de concentration en spermatozoïdes des éjaculats : plus que la séropositivité vis-à-vis de la besnoitiose, ce sont les signes cliniques de la maladie et les lésions génitales qui sont associés à une plus faible production de spermatozoïdes.

d. Test de Schalm

24 taureaux sur les 36 dont l'éjaculat a été récolté ont présenté un test de Schalm négatif. 5 ont présenté une faible réaction de 1+ au test de Schalm, 6 une réaction de 2+, et 1 une réaction de 3+ (Tableau 18).

Tableau 18 : Résultats des tests de Schalm réalisés sur les éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose

Schalm	Tous les taureaux (n=36)	Séronégatifs (n=9)	Séropositifs sans signe clinique (n=15)	Séropositifs avec signes cliniques (n=9)
0	24	6 a	12 a	6 a
1+	5	2	1	2
2+	6	3	2	1
3+	1	0	1	0
4+	0	0	0	0

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$).

La réaction au test de Schalm sur les éjaculats collectés sur les taureaux n'a pas été différente (Test de χ^2) en fonction de leur statut vis-à-vis de la besnoitiose ou de la sévérité de leurs lésions génitales (données non représentées).

Les tests de Schalm ont été négatifs sur le liquide pré-spermatique des 4 taureaux dont la semence n'a pas été récoltée.

e. Motilité massale

La moyenne \pm écart-type des motilités massales des éjaculats obtenus sur les 36 taureaux est de $3,43 \pm 1,38$ (Tableau 19).

Tableau 19 : Motilités massales des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose

	Tous les taureaux (n=36)	Séronégatifs (n=11)	Séropositifs sans signe clinique (n=16)	Séropositifs avec signes cliniques (n=9)
Moyenne ± écart-type	3,43 ± 1,38	4,27 ± 1,01	a 3,66 ± 1,21	a 2,00 ± 1,00 b
Médiane	3,75	5,00	3,75	2,00
Etendue	[1 ; 5]	[2 ; 5]	[2 ; 5]	[1 ; 4]
Nombre dans v.u.	33	11	16	6
Proportion dans v.u.	92 %	100 %	100 % a	67 % b

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$). (valeurs usuelles (v.u.) : ≥ 2)

Les éjaculats obtenus sur les taureaux séronégatifs et séropositifs sans signe clinique ont eu des motilités massales plus élevées que ceux des taureaux séropositifs avec signes cliniques ($p=0,001$, Kruskal-Wallis). Par contre, il n'y a pas de différence observée entre les taureaux séronégatifs et les taureaux séropositifs sans signe clinique.

De plus, les 27 taureaux ne présentant pas de signes cliniques (séronégatifs et séropositifs) ont eu des motilités massales supérieures ou égales à 2, c'est-à-dire considérées comme satisfaisantes. Par contre, 3/9 (33 %) taureaux présentant des signes cliniques de besnoitiose ont eu une motilité massale insuffisante. Cette différence comparée aux taureaux séropositifs sans signe clinique est significative ($p=0,042$, test exact de Fisher et correction de Bonferroni) et à tendance significative comparée aux taureaux séronégatifs ($p=0,11$, test exact de Fisher et correction de Bonferroni).

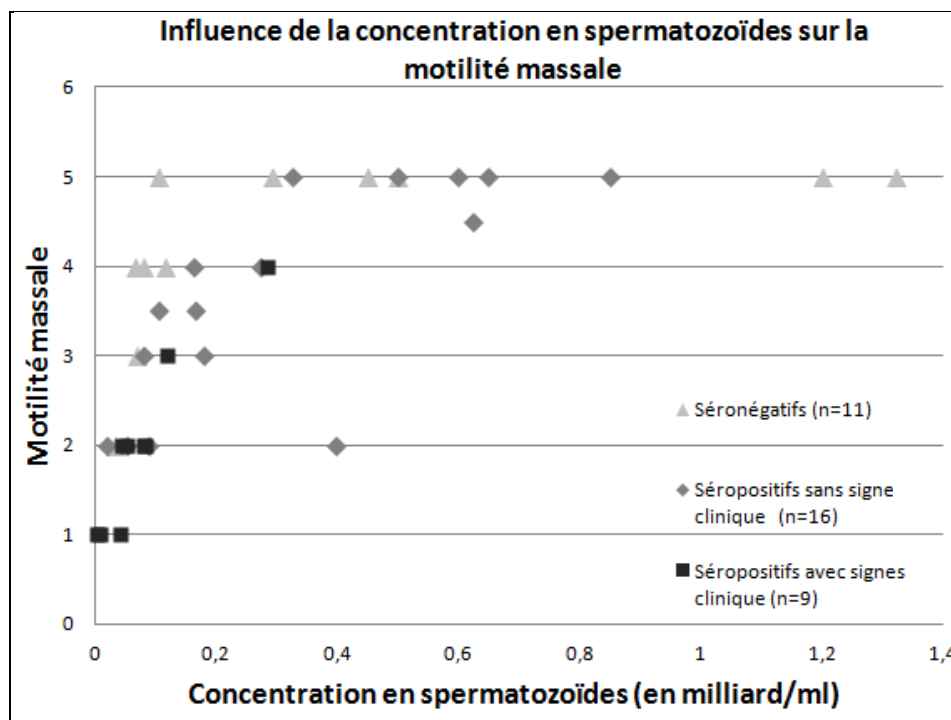
Lorsque sont comparées les motilités massales des taureaux ayant différents scores cliniques, des différences significatives ont également été observées ($p=0,001$, Kruskal-Wallis) : les taureaux sans lésion génitale ont produit des éjaculats ayant des motilités massales supérieures à celles des éjaculats des autres taureaux. De plus, plus de la moitié des éjaculats des taureaux atteints de lésions génitales sévères ont eu une motilité massale considérée insuffisante, contrairement aux éjaculats des taureaux présentant des lésions génitales modérées et de ceux ne présentant pas de lésion génitale. Cette différence est significative (respectivement $p=0,0006$ et $p=0,012$, tests exacts de Fisher et correction de Bonferroni) (Tableau 20).

Tableau 20 : Motilités massales des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales

	Tous les taureaux (n=36)	Sans lésion génitale (n=20)	Lésions génitales modérées (n=11)	Lésions génitales sévères (n=5)
Moyenne ± écart-type	3,43 ± 1,38	4,00 ± 1,18 a	2,95 ± 1,15 b	2,20 ± 1,64 b
Médiane	3,75	4,25	3,00	1,00
Etendue	[1 ; 5]	[2 ; 5]	[2 ; 5]	[1 ; 4]
Nombre dans v.u.	33	20	11	2
Proportion dans v.u.	92 %	100 % a	100 % a	40 % b

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$). (valeurs usuelles (v.u.) : ≥ 2)

La motilité massale dépend de la concentration de l'éjaculat en spermatozoïdes et du taux de spermatozoïdes en mouvement, et la variation de ces deux critères a un fort impact sur la valeur de la motilité massale (BARTH, 2007). Or une variation de la concentration en spermatozoïdes a été observée entre les différents groupes de taureaux dans les paragraphes précédents. En comparant cette variation à celle de la motilité massale, une corrélation apparaît entre les deux paramètres, la motilité massale augmentant avec la concentration (*Graphique 2*) ($p < 0,0001$, test de corrélation de Spearman).



Graphique 2 : Influence de la concentration en spermatozoïdes sur la motilité massale des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation

Ainsi, d'après ces résultats, il est probable que la variation de la motilité massale soit liée à la concentration en spermatozoïdes plus qu'au taux de spermatozoïdes en mouvement, paramètre qui est évalué au travers de la motilité individuelle.

f. Motilité individuelle

La motilité individuelle moyenne \pm écart-type des 36 éjaculats est de 60 ± 18 %, avec des valeurs allant de 20 à 85 % (Tableau 21).

Tableau 21 : Motilités individuelles des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose

	Tous les taureaux (n=36)	Séronégatifs (n=11)	Séropositifs sans signe clinique (n=16)	Séropositifs avec signes cliniques (n=9)
Moyenne \pm écart-type	60 \pm 18 %	65 \pm 15 % a	61 \pm 20 % a	52 \pm 15 % a
Médiane	60 %	70 %	65 %	55 %
Etendue	[20 ; 85] %	[40 ; 85] %	[20 ; 80] %	[25 ; 75] %
Nombre dans v.u.	33	11	14	8
Proportion dans v.u.	92 %	100 %	88 %	89 %

Deux lettres différentes (a, b) une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$).
(valeurs usuelles (v.u.) : > 30 %)

Aucune différence significative n'a été objectivée concernant la motilité individuelle entre les éjaculats des taureaux des différents statuts sanitaires vis-à-vis de la besnoitiose.

Tableau 22 : Motilités individuelles des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales

	Tous les taureaux (n=36)	Sans lésion génitale (n=20)	Lésions génitales modérées (n=11)	Lésions génitales sévères (n=5)
Moyenne \pm écart-type	60 \pm 18 %	64 \pm 17 % a	55 \pm 21 % a	53 \pm 7 % a
Médiane	60 %	65 %	60 %	50 %
Etendue	[20 ; 85] %	[20 ; 85] %	[20 ; 75] %	[45 ; 60] %
Nombre dans v.u.	33	19	9	5
Proportion dans v.u.	92 %	95 %	82 %	100 %

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$).
(valeurs usuelles (v.u.) : > 30 %)

De même, aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant la motilité individuelle entre les éjaculats des taureaux avec ou sans lésion génitale (Tableau 22).

Ainsi, les différences de motilités massales décrites précédemment sont expliquées par les différences de concentrations en spermatozoïdes et non par des différences de motilité individuelle des spermatozoïdes.

Cette observation rejoint la remarque de BARTH en 2008 qui affirme que le parenchyme testiculaire sain est capable de continuer à produire des spermatozoïdes mobiles. Ainsi, chez les taureaux atteints de lésions testiculaires même sévères, le peu de spermatozoïdes produits sont mobiles, d'où une motilité individuelle inchangée.

g. Taux de mortalité des spermatozoïdes

Lors de la lecture des lames colorées pour évaluer le taux de mortalité, tous les spermatozoïdes étaient colorés (donc morts) sur plusieurs lames, alors même que les motilités massales et individuelles n'étaient pas nulles dans les éjaculats respectifs. Cette anomalie, qui concerne 6 taureaux parmi les 36 (3 taureaux séronégatifs et 3 taureaux séropositifs sans signe clinique), est probablement liée à une altération des membranes des spermatozoïdes survenue entre la récolte et la coloration, comme évoqué dans le paragraphe « 3.c. Examen de la semence ».

Les résultats de mortalité des gamètes ont donc été calculés à partir des 30 autres éjaculats (Tableaux 23 et 24). Le statut sanitaire des taureaux vis-à-vis de la besnoitiose et la sévérité de leurs lésions génitales n'ont pas eu d'impact sur la vitalité des spermatozoïdes.

De la même façon que pour la motilité individuelle, l'absence de différence de mortalité est sans doute liée à la capacité du parenchyme testiculaire sain à produire des spermatozoïdes vivants.

Tableau 23 : Pourcentage de spermatozoïdes morts dans les éjaculats collectés sur 30 taureaux par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose

	Tous les taureaux (n=36)	Séronégatifs (n=11)	Séropositifs sans signe clinique (n=16)	Séropositifs avec signes cliniques (n=9)
Moyenne ± écart-type	38 ± 17 %	39 ± 16 % ^a	32 ± 17 % ^a	45 ± 18 % ^a
Médiane	37 %	39 %	25 %	48 %
Etendue	[15 ; 74] %	[15 ; 63] %	[16 ; 68] %	[16 ; 74] %
Nombre dans v.u.	18	4	10	4
Proportion dans v.u.	50 %	50 %	77 %	44 %

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$). (valeurs usuelles (v.u.) : < 40 %)

Tableau 24 : Pourcentage de spermatozoïdes morts dans les éjaculats collectés sur 30 taureaux par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales

	Tous les taureaux (n=36)	Sans lésion génitale (n=20)	Lésions génitales modérées (n=11)	Lésions génitales sévères (n=5)
Moyenne ± écart-type	38 ± 17 %	37 ± 14 % ^a	35 ± 19 % ^a	48 ± 19 % ^a
Médiane	37 %	38 %	32 %	32 %
Etendue	[15 ; 74] %	[15 ; 56] %	[16 ; 68] %	[23 ; 74] %
Nombre dans v.u.	18	8	8	2
Proportion dans v.u.	50 %	57 %	73 %	40 %

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$). (valeurs usuelles (v.u.) : < 40 %)

h. Taux d'anomalies des spermatozoïdes

Les résultats des taux d'anomalies spermatiques totales et des anomalies de tête, de pièce intermédiaire et de queue sont présentés dans les Tableaux 25 et 26.

Tableau 25 : Taux d'anomalies des spermatozoïdes dans les éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose

Anomalies :		Tous les taureaux (n=36)	Séronégatifs (n=11)	Séropositifs sans signe clinique (n=16)	Séropositifs avec signes cliniques (n=9)
Totales	Moyenne ± écart-type	20 ± 16 %	19 ± 19 % ^a	21 ± 17 % ^a	20 ± 13 % ^a
	Médiane	17 %	16 %	16 %	19 %
	Etendue	[3 ; 74] %	[3 ; 66] %	[5 ; 74] %	[5 ; 49] %
De tête	Moyenne ± écart-type	7 ± 7 %	4 ± 3 % ^a	8 ± 10 % ^a	8 ± 6 % ^a
	Médiane	5 %	5 %	5 %	8 %
	Etendue	[0 ; 38] %	[0 ; 10] %	[1 ; 38] %	[2 ; 24] %
De pièce intermédiaire	Moyenne ± écart-type	7 ± 11 %	11 ± 17 % ^a	5 ± 8 % ^a	6 ± 5 % ^a
	Médiane	4 %	3 %	4 %	5 %
	Etendue	[0 ; 56] %	[0 ; 56] %	[0 ; 34] %	[1 ; 18] %
De queue	Moyenne ± écart-type	6 ± 5 %	4 ± 3 % ^a	7 ± 7 % ^b	6 ± 3 % ^b
	Médiane	5 %	3 %	6 %	6 %
	Etendue	[0 ; 32] %	[1 ; 9] %	[0 ; 32] %	[3 ; 13] %

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs tendant à être significativement différentes ($p \leq 0,1$).

Les taux d'anomalies totales, d'anomalies de tête et d'anomalies de pièce intermédiaire sont similaires chez les taureaux séronégatifs et séropositifs vis-à-vis de la besnoitiose. Cependant, les anomalies de queue tendent à être plus fréquentes chez les taureaux séropositifs que chez les séronégatifs ($p=0,097$, Kruskal-Wallis).

Tableau 26 : Taux d'anomalies des spermatozoïdes dans les éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de la sévérité de leurs lésions génitales

Anomalies :		Tous les taureaux (n=36)	Sans lésion génitale (n=20)	Lésions génitales modérées (n=11)	Lésions génitales sévères (n=5)
Totales	Moyenne ± écart-type	20 ± 16 %	18 ± 16 % a	16 ± 9 % a	38 ± 19 % b
	Médiane	17 %	15 %	15 %	32 %
	Etendue	[3 ; 74] %	[3 ; 74] %	[5 ; 36] %	[19 ; 66] %
De tête	Moyenne ± écart-type	7 ± 7 %	7 ± 8 % a	5 ± 3 % a	13 ± 8 % b
	Médiane	5 %	5 %	4 %	8 %
	Etendue	[0 ; 38] %	[0 ; 38] %	[1 ; 10] %	[6 ; 24] %
De pièce intermédiaire	Moyenne ± écart-type	7 ± 11 %	6 ± 9 % a	4 ± 3 % a	17 ± 23 % a
	Médiane	4 %	4 %	4 %	5 %
	Etendue	[0 ; 56] %	[0 ; 34] %	[1 ; 8] %	[2 ; 56] %
De queue	Moyenne ± écart-type	6 ± 5 %	4 ± 3 % a	8 ± 8 % a	9 ± 3 % b
	Médiane	5 %	5 %	6 %	10 %
	Etendue	[0 ; 32] %	[0 ; 9] %	[2 ; 32] %	[5 ; 13] %

Deux lettres différentes (a, b) sur une même ligne indiquent des valeurs significativement différentes ($p \leq 0,05$) ou tendant à être significativement différentes ($p \leq 0,1$, pour la ligne *De tête*).

Chez les taureaux présentant des lésions génitales sévères, le taux d'anomalies totales a été supérieur à celui observé chez les taureaux des autres groupes ($p=0,033$, Kruskal-Wallis). Cette différence est expliquée par une plus faible proportion d'anomalies de queue chez les taureaux sans lésions génitales sévères ($p=0,023$, Kruskal-Wallis) et de manière moins importante par une différence de taux d'anomalies de tête ($p=0,087$, Kruskal-Wallis). Par contre, le taux d'anomalies de la pièce intermédiaire n'a pas été augmenté chez les taureaux atteints de lésions génitales.

Les anomalies de tête, et de queue dans une moindre mesure, sont majoritairement des anomalies primaires, c'est-à-dire des anomalies survenues pendant la phase testiculaire de la spermatogenèse (FERNANDES et al., 2008).

Ainsi, les taureaux séropositifs présentent plus d'anomalies de queue que les séronégatifs. Ce résultat correspond à l'hypothèse d'une altération du parenchyme testiculaire consécutive à la présence de kystes parasitaires.

De plus, les taureaux présentant des lésions génitales sévères présentent plus d'anomalies spermatiques, en particulier de tête et de queue, que les mâles sains ou modérément atteints. Puisque les lésions retenues dans cette étude sont principalement des lésions testiculaires, ce résultat était attendu.

i. Score séminologique

Les paramètres séminologiques ont été globalement dégradés chez les taureaux séropositifs, en particulier chez ceux présentant des signes cliniques, et chez ceux atteints de lésions testiculaires.

Le score séminologique, décrit au paragraphe « 6. Evaluation de la fonction sexuelle », est fondé sur la quantité de spermatozoïdes, la motilité individuelle et le taux d'anomalie des spermatozoïdes dans chaque éjaculat.

Tableau 27 : Scores séminologiques des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de leur statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose

		Tous les taureaux (n=36)	Séronégatifs (n=11)	Séropositifs sans signe clinique (n=16)	Séropositifs avec signes cliniques (n=9)
Satisfaisant	Nombre	11	5	5	1
	Proportion	31 %	45 %	31 %	11 %
Moyen	Nombre	21	5	10	6
	Proportion	58 %	45 %	63 %	67 %
Médiocre	Nombre	4	1	1	2
	Proportion	11 %	9 %	6 %	22 %

Aucune différence significative n'a été observée entre les scores séminologiques des taureaux des différents statuts sanitaires (Tableau 27).

Tableau 28 : Scores séminologiques des éjaculats collectés sur 36 taureaux par électroéjaculation en fonction de leurs lésions génitales

		Tous les taureaux (n=36)	Sans lésion génitale (n=20)	Lésions génitales modérées (n=11)	Lésions génitales sévères (n=5)
Satisfaisant	Nombre	11	9	2	0
	Proportion	38 %	45 %	18 %	0 %
Moyen	Nombre	21	11	8	2
	Proportion	58 %	55 %	73 %	40 %
Médiocres	Nombre	4	0	1	3
	Proportion	11 %	0 %	9 %	60 %

Les taureaux présentant des lésions génitales sévères ont eu des scores séminologiques en moyenne plus faibles que les taureaux sans lésion ou que les taureaux avec des lésions génitales modérées ($p=0,005$, Kruskal-Wallis).

Les proportions de taureaux dont les scores séminaux sont classés dans les catégories Satisfaisant, Moyen et Médiocre diffèrent également en fonction de la sévérité des lésions génitales (Tableau 28) :

- 9 des 11 éjaculats qualifiés de Satisfaisant appartiennent à des taureaux sans lésion génitale, et aucun taureau atteint de lésions génitales sévères n'a produit de sperme classé dans la catégorie Satisfaisant.
- 3 des 4 éjaculats qualifiés de Médiocre appartiennent à des taureaux ayant des lésions génitales sévères, et aucun taureau sans lésion génitale n'a produit d'éjaculat classé dans la catégorie Médiocre. Cette différence est significative ($p=0,005$, test exact de Fisher).

6. Bilan

a. Paramètres séminologiques

Le Tableau 29 récapitule les effets du statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose et des lésions génitales sur la qualité séminologique.

Tableau 29 : Récapitulatif des différences observées entre les catégories de taureaux (statut sanitaire vis-à-vis de la besnoitiose et lésions génitales) pour les paramètres séminologiques

Paramètre	Statut sérologique	Score clinique
Nombre de stimulations	Plus élevé chez les taureaux séropositifs (avec ou sans signes cliniques)	Pas de différence
Volume de l'éjaculat	Pas de différence	Pas de différence
Concentration en spermatozoïdes	Plus faible chez les taureaux séropositifs avec signes cliniques	Plus faible chez les taureaux ayant des lésions génitales
Quantité de spermatozoïdes	Tendant à être plus faible chez les taureaux séropositifs avec signes cliniques	Plus faible chez les taureaux ayant des lésions génitales sévères
Test de Schalm	Pas de différence	Pas de différence
Motilité massale	Plus faible chez les taureaux séropositifs avec signes cliniques	Plus faible chez les taureaux ayant des lésions génitales
Motilité individuelle	Pas de différence	Pas de différence
Taux de mortalité des spermatozoïdes	Pas de différence	Pas de différence
Taux d'anomalies totales des spermatozoïdes	Pas de différence	Plus élevé chez les taureaux ayant des lésions génitales sévères
Taux d'anomalies de tête	Pas de différence	Tendant à être plus élevé chez les taureaux ayant des lésions génitales sévères
Taux d'anomalies de pièce intermédiaire	Pas de différence	Pas de différence
Taux d'anomalie de queue	Tendant à être plus élevé chez les taureaux séropositifs (avec ou sans signes cliniques)	Plus élevé chez les taureaux ayant des lésions génitales sévères
Score séminologique	Pas de différence	Plus élevé chez les taureaux ayant des lésions génitales sévères

Dans ce tableau, il apparaît que la fonction sexuelle est altérée chez les taureaux séropositifs avec signes cliniques, c'est-à-dire atteints cliniquement de besnoitiose, par rapport aux autres. En effet, chez eux, le nombre de stimulations permettant l'électroéjaculation, la concentration en spermatozoïdes, leur quantité par éjaculat, la motilité massale et le taux d'anomalies de la queue des spermatozoïdes sont dégradés.

Comme cela était prévisible, les lésions de l'appareil génital, notamment sévères, ont altéré la plupart des paramètres séminologiques, mis à part le volume des éjaculats, la motilité individuelle, les tests de Schalm et les taux de mortalités et d'anomalies de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes. En outre, lorsque les lésions étaient seulement modérées, la concentration en spermatozoïdes dans les éjaculats et leur motilité massale ont été altérées.

b. Bilan général

L'ADN de *Besnoitia besnoiti* n'a pas été détecté dans la semence des 40 taureaux testés. Cette recherche a été réalisée par qPCR dont la sensibilité est estimée à 2,5 parasites par test.

Ce résultat est en accord avec les données de KUMI-DIAKA en 1981. Ce dernier avait déjà révélé une absence de parasite dans le sperme de 4 taureaux infectés chroniques. Cependant, dans son étude, KUMI-DIAKA avait cherché *Besnoitia besnoiti* au microscope, c'est-à-dire par une méthode beaucoup moins sensible que la qPCR utilisée dans cette étude.

Mais malgré la sensibilité de la qPCR, l'absence du parasite dans la semence de taureaux séropositifs et même cliniquement atteints est à nuancer. En effet, même si aucun kyste n'a jamais été mis en évidence dans les glandes annexes et l'urètre, leur présence a été démontrée dans les tubes séminifères et les épидидymes (EUZEBY, 1987 ; KUMI-DIAKA et al., 1981). Ainsi, la rupture de kystes dans les conduits génitaux pourrait entraîner la présence des parasites dans la semence de manière intermittente. Une excrétion intermittente dans le sperme de taureau a d'ailleurs été démontrée pour *Neospora caninum* par FERRE et al. en 2005. Dans leur étude, le protozoaire a été trouvé à une concentration maximale de 10 parasites par millilitre de sperme. Ce faible nombre de parasites, associé à une excrétion intermittente, pourrait donc expliquer la difficulté de mettre en évidence *Besnoitia besnoiti* dans le sperme des taureaux, pour autant que cette excrétion existe.

Ainsi, à partir de notre étude, nous pouvons dire que le risque transmission de *Besnoitia besnoiti* par le sperme de taureaux infectés chroniques est très faible.

Par contre, la transmission du parasite lors de la saillie n'a pas été envisagée dans cette étude. En effet, lors du coït, le pénis du mâle entre en contact avec la muqueuse vaginale de la femelle. La rupture de kystes à bradyzoïtes présents dans

les muqueuses (ALZIEU et al., 2007) pourrait alors permettre la transmission de la maladie au cours de la saillie.

De plus, aucune conclusion ne peut être proposée concernant la transmission du parasite pendant la phase aigüe de la besnoitiose. Cependant, durant cette phase, les taureaux sont dans un état fébrile intense qui ne leur permet probablement pas de saillir les femelles.

Cette étude a également mis en évidence une relation significative entre la présence de lésions de l'appareil génital et le statut sanitaire des taureaux vis-à-vis de la besnoitiose : les taureaux séropositifs présentaient plus de lésions de fibrose testiculaire modérées à sévères, et les taureaux cliniquement infectés par le parasite présentaient plus d'anomalies génitales modérées à sévères allant de l'hyperkératose scrotale jusqu'à la dégénérescence testiculaire. A l'opposé, aucun taureau séronégatif ne présentait de lésion sévère. Toutefois, l'imputabilité de la besnoitiose n'est pas démontrée. En effet, d'autres affections associées ou non à de l'hyperthermie peuvent conduire à des lésions de fibrose testiculaire ou d'épaississement cutané du scrotum.

Cette étude a également mis en évidence une relation entre la présence de lésions génitales, notamment sévère, et une dégradation de la qualité de la semence.

En définitive, cette étude montre que la besnoitiose sous forme clinique, même fruste, est associée à une augmentation du nombre de lésions testiculaires, et que ces lésions testiculaires sont responsables d'une dégradation de la qualité du sperme.

Cependant, en l'absence de signe clinique, la besnoitiose n'induit pas d'altération de la qualité des éjaculats entre les taureaux séropositifs et les taureaux séronégatifs.

Il semblerait donc que l'infestation des taureaux séropositifs sans signe clinique est plus faible que celle des taureaux séropositifs avec signes cliniques. Or la quantité de parasites dans les tissus pourrait être associée à la sévérité des lésions : dans les testicules par exemple, les troubles de la thermorégulation et la pression des kystes

sur les cellules germinales pourraient induire leur nécrose et des lésions de fibrose consécutives (KUMI-DIAKA et al., 1981). Ainsi, chez les taureaux séropositifs sans signe clinique, la plus faible infestation parasitaire pourrait expliquer l'absence de répercussion sur la qualité séminologique.

Une autre explication pourrait être liée à un biais lors de la constitution des trois groupes de taureaux (séronégatifs, séropositifs sans signe clinique et séropositifs avec signes cliniques). En effet, dans cette étude, les 40 animaux ont été sélectionnés sur la base du volontariat des éleveurs et non pas par une sélection aléatoire. Une différence d'âge est observée entre les trois groupes : les taureaux séronégatifs sont en moyenne plus jeunes que les séropositifs sans et avec signes cliniques (respectivement $2,26 \pm 1,39$ ans contre $4,58 \pm 1,63$ et $4,03 \pm 1,95$ ans ; $p=0,001$, Kruskal-Wallis). Cette différence d'âge est associée à une différence de circonférence scrotale ($37,0 \pm 1,95$ cm chez les taureaux séronégatifs, contre $39,8 \pm 2,80$ cm chez les taureaux séropositifs sans signe clinique et $40,1 \pm 2,71$ cm chez les taureaux séropositifs avec signes cliniques ; $p=0,009$, Kruskal-Wallis). Or, chez de jeunes taureaux tels que 10 des 11 taureaux séronégatifs de l'étude, la circonférence scrotale est corrélée de manière importante à la production de spermatozoïdes (WILLETT, OHMS, 1957).

Ainsi, ces différences entre les groupes de taureaux ont pu apporter un biais dans l'analyse de l'effet de la besnoitiose sur certains paramètres séminologiques. Par exemple, la quantité de spermatozoïdes par éjaculat dépend de la circonférence scrotale et par conséquent, la non-homogénéité des lots de taureaux a pu réduire les différences liées à la maladie.

La différence d'âge des taureaux séronégatifs est probablement liée au caractère enzootique de la besnoitiose dans le canton de Seyne-Les-Alpes. Dans ce schéma épidémiologique, l'âge est considéré comme un facteur de risque, et la probabilité de contamination par *Besnoitia besnoiti* augmente avec l'âge des taureaux (ALVAREZ-GARCIA et al., 2013).

Conclusion

En conclusion, cette étude a montré que le sperme n'est sans doute pas une source de contamination majeure pour la besnoitiose.

Par contre, les lésions de l'appareil génital sont plus nombreuses chez les taureaux présentant des signes cliniques de besnoitiose, même lorsque ces signes cliniques sont frustes (kystes scléaux, hyperkératose limitée).

Cette étude a mis en évidence une relation entre ces lésions et la qualité du sperme des taureaux, et entre la besnoitiose chronique et une dégradation de la qualité de la semence des taureaux atteints.

Cependant, cette altération ne concerne que les taureaux présentant des signes cliniques de la maladie, caractérisés par la présence de kystes sur la sclère ou un épaissement cutané. Les taureaux séropositifs sans signe clinique et sans lésion génitale modérée à sévère n'ont pas montré de dégradation de la qualité de leur sperme.

Donc dans une zone d'enzootie comme le canton de Seyne-Les-Alpes où l'éradication de la besnoitiose est actuellement impossible à cause de l'absence de traitement ou de vaccin efficaces, l'utilisation d'un taureau séropositif en monte naturelle peut ne pas avoir de conséquence néfaste sur les paramètres de reproduction du troupeau, à condition que ce taureau soit asymptomatique vis-à-vis de la besnoitiose et sans lésion génitale importante. De plus, l'arrivée dans une zone d'enzootie d'un animal sain vis-à-vis de la besnoitiose augmente le risque pour cet animal de développer une forme clinique de la maladie. Il est donc préférable pour les éleveurs de conserver leurs animaux séropositifs sans signe clinique dont la probabilité de développer une forme clinique de besnoitiose est faible.

Cependant, un animal séropositif, même asymptomatique, est porteur de kystes parasites. Il est donc une source possible de contamination pour les autres animaux du troupeau et des troupeaux voisins par l'intermédiaire des insectes hématophages (ALVAREZ-GARCIA et al., 2013).

Donc, pour conclure, il est recommandé de ne pas garder de taureaux séropositifs et cliniquement atteints de besnoitiose, en raison d'une part de la

dégradation de la qualité de leur semence, et d'autre part du risque de contamination à partir du réservoir de parasites qu'ils constituent.

Concernant les taureaux séropositifs sans signe clinique de besnoitiose, deux cas sont à envisager :

- dans une région d'enzootie vis-à-vis de la besnoitiose, leur élimination n'est pas conseillée. En effet, ces individus n'ont que peu de risque de développer une forme clinique de la maladie car ils vivent dans un état d'équilibre avec le parasite, et leur fonction sexuelle est conservée. Leur remplacement par des animaux sains provenant de zones indemnes de besnoitiose risque au contraire d'aboutir au développement d'une forme clinique de la maladie chez ces animaux naïfs importés.
- dans une région relativement indemne de besnoitiose, l'élimination du taureau est préconisée. En effet, même s'ils sont potentiellement aussi fertiles que les individus séronégatifs, les animaux séropositifs constituent aussi un réservoir de parasites pour le reste du troupeau et les élevages alentour.

Bibliographie

- AGOSTI, M., BELLONI, A., MORINI, M. et VACIRCA, G., 1994. Segnalazione di un focolaio di Besnoitiosi in bovini da carne importati. In : *Praxis Vet.* 1994. Vol. 15, p. 5-6.
- ALVAREZ-GARCIA, G., FREY, C.F., MORA, L.M.O. et SCHARES, G., 2013. A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. In : *Trends in Parasitology.* 2013. Vol. 29, n° 8, p. 407-415.
- ALZIEU, J.P., DORCHIES, P., SCHELCHER, F. et GOTTSTEIN, B., 2007. L'extension de la besnoitiose bovine en France. In : *Point Vétérinaire.* 2007. Vol. 38, p. 37-43.
- AMANN, R. P., 1983. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. In : *Journal of Dairy Science.* 1983. Vol. 66, n° 12, p. 2606-2622.
- BARONE, R., 2001. Chapitre 2: Appareil génital. In : *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4, Splanchnologie II.* Paris : Barone.
- BARTH, A.D., 2007. Chapter 31 - Evaluation of potential breeding soundness of the bull. In : *Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* 2nd Edition. Philadelphia, Saunders : THRELFALL, W.R. et YOUNQUIST R.S. p. 228-240.
- BARTH, A.D., ALISIO, L., AVILES, M., ARTEAGA, A.A., CAMPBELL, J.R. et HENDRICK, S.H., 2008. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. In : *Animal Reproduction Science.* 2008. Vol. 106, n° 3, p. 274-288.
- BASSO, W., SCHARES, G., GOLLNICK, N.S., RUTTEN, M. et DEPLAZES, P., 2011. Exploring the life cycle of *Besnoitia besnoiti* - Experimental infection of putative definitive and intermediate host species. In : *Veterinary Parasitology.* 2011. Vol. 178, n° 3-4, p. 223-234.
- BERNDTSON, W. E. et IGBOELI, G., 1988. Spermatogenesis, sperm output and seminal quality of Holstein bulls electroejaculated after administration of oxytocin. In : *Journal of reproduction and fertility.* 1988. Vol. 82, n° 2, p. 467-475.
- BESNOIT, Ch. et ROBIN, V., 1912. Sarcosporidiose cutanée chez une vache. In : *Revue Vétérinaire.* 1912. Vol. 37, n° 649, p. 63.
- BIGALKE, R.D., 1968. New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. In : *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research.* 1968. Vol. 35, n° 1, p. 3-137.
- BRITO, L.F.C., SILVA, A.E.D., BARBOSA, R.T., UNANIAN, M.M. et KASTELIC, J.P., 2003. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls. In : *Animal Reproduction Science.* 2003. Vol. 79, n° 1, p. 1-15.

CLERMONT, Y., 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. In : *Physiological Reviews*. 1972. Vol. 52, n° 1, p. 198-236.

CONSTANTINESCU, G. et CONSTANTINESCU, I., 2003. *Clinical Dissection Guide for Large Animals: Horse and Large Ruminants*. 2e édition. Ames, Iowa : Wiley-Blackwell.

CORTES, H., LEITAO, A., GOTTSTEIN, B. et HEMPHILL, A., 2014. A review on bovine besnoitiosis: a disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges,). In : *Parasitology*. 2014. Vol. 141, n° 11, p. 1406-1417.

CORTES, H., LEITAO, A., VIDAL, R., VILA-VICOSA, M.J., FERREIRA, M.L., CAEIRO, V. et HJERPE, C.A., 2005. Besnoitiosis in bulls in Portugal. In : *The Veterinary Record*. 2005. Vol. 157, n° 9, p. 262-264.

CORTES, H., NUNES, S., REIS, Y., STAUBLI, D., VIDAL, R., SAGER, H., LEITAO, A. et GOTTSTEIN, B., 2006. Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot. In : *Veterinary Parasitology*. 2006. Vol. 141, n° 3-4, p. 216-225.

COULTER, G.H., MAPLETOFT, R.J., KOZUB, G.C. et CATES, W.F., 1987. Scrotal circumference of two-year-old bulls of several beef breeds. In : *Theriogenology*. 1987. Vol. 27, n° 3, p. 485-491.

CUISENIER, C., 1996. Contribution à l'étude de l'importance de l'examen du sperme, dans le contrôle d'aptitude à la reproduction des taureaux de monte naturelle. Thèse de doctorat vétérinaire. France : Ecole Nationale Vétérinaire de Maison Alfort.

DIESING, L., HEYDORN, A.O., MATUSCHKA, F.R., BAUER, C., PIPANO, E., DE WAAL, D.T. et POTGIETER, F.T., 1988. *Besnoitia besnoiti*: studies on the definitive host and experimental infections in cattle. In : *Parasitology Research*. 1988. Vol. 75, n° 2, p. 114-117.

DUMONT, P., 1997. Évaluation de la fonction reproductrice du taureau. In : *Le Point Vétérinaire*. 1997. Vol. 185, n° 28, p. 19-32.

EASLEY, G.T., 1970. A hand electrode for the electroejaculation of bulls. In : *Bovine Practitioner*. 1970. Vol. 5, n° 12-13, p. 16.

EFSA, 2010. *Bovine besnoitiosis: An emerging disease in Europe*. Parma, Italy. Scientific statement on Bovine besnoitiosis.

EUZEBY, J., 1987. *Protozoologie médicale comparée : les protozooses des animaux et leurs relations avec les protozooses de l'homme*. Vol. 2, *Myxozoa-Microspora-Ascetospora-Apicomplexa, 1: Coccidioses (Sensus Lato)*. S.I. : Fondation Marcel Merieux. S.I. : s.n.

FERNANDES, C.E., DODE, M.A.N., PEREIRA, D. et SILVA, A.E.D.F., 2008. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. In : *Theriogenology*. 2008. Vol. 70, n° 9, p. 1560-1568.

FERNANDEZ-GARCIA, A., RISCO-CASTILLO, V., PEDRAZA-DIAZ, S., AGUADO-MARTINEZ, A., ALVAREZ-GARCIA, G., GOMEZ-BAUTISTA, M., COLLANTES-FERNANDEZ, E. et ORTEGA-MORA, L.M., 2009. First Isolation of *Besnoitia besnoiti* from a Chronically Infected Cow in Spain. In : *Journal of Parasitology*. 2009. Vol. 95, n° 2, p. 474-476.

FERRE, I., ADURIZ, G., DEL-POZO, I., REGIDOR-CERRILLO, J., ATXAERANDIO, R., COLLANTES-FERNANDEZ, E., HURTADO, A., UGARTE-GAZAGALZA, C. et ORTEGA-MORA, L.M., 2005. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. In : *Theriogenology*. 2005. Vol. 63, n° 5, p. 1504-1518.

FOSTER, J., ALMQUIST, J.O. et MARTIG, R.C., 1970. Reproductive capacity of beef bulls. IV. Changes in sexual behavior and semen characteristics among successive ejaculations. In : *Journal of Animal Science*. 1970. Vol. 30, n° 2, p. 245-252.

FOUQUET, C., 2009. La besnoitiose bovine : suivi épidémiologique l'épizootie de la région PACA. Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon : Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.

FOURNIER-DELPECH, S., COLAS, G., COUROT, M., ORTAVANI, R., BRICE, G., CORNU, C., GUERIN, Y. et LEBRETON, Y., 1979. Epididymal sperm maturation in the ram: motility, fertilizing ability and embryonic survival after uterine artificial insemination in the ewe. In : *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. S.I. : EDP Sciences. 1979. p. 597-605.

FRANCO, E.E. et BORGES, I., 1915. Nota sobre a sarcosporidiose bovina. In : *Revista de Medicina Veterinaria*. 1915. Vol. 165, p. 255-299.

GARCIA-LUNAR, P., ORTEGA-MORA, L.M., SCHARES, G., GOLLNICK, N.S., JACQUIET, P., GRISEZ, C., PREVOT, F., FREY, C.F., GOTTSTEIN, B. et ALVAREZ-GARCIA, G., 2013. An inter-laboratory comparative study of serological tools employed in the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection in bovines: bovine besnoitiosis: comparative study of serological tests. In : *Transboundary and Emerging Diseases*. 2013. Vol. 60, n° 1, p. 59-68.

GENEST, M., 2008. La besnoitiose bovine à *Besnoitia besnoiti*: enquête sérologique et écologique dans un foyer d'émergence du Maine et Loire. Thèse de doctorat vétérinaire. Nantes : Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes.

GOURREAU, J.M., FRANC, M. et POLACK, B., 2000. La besnoitiose. In : *Maladies des bovins*. 3e édition. Paris : France Agricole.

HAFEZ, E.S.E., 1987. Chapitre 9: Spermatozoa and seminal plasma. In : *Reproduction in farm animals*. 5e édition. Philadelphia : Lea Febiger : s.n.

HOPKINS, F.M. et SPITZER, J.C., 1997. The new Society for Theriogenology breeding soundness evaluation system. In : *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 1997. Vol. 13, n° 2, p. 283-293.

HORNOK, S., FEDAK, A., BASKA, F., HOFMANN-LEHMANN, R. et BASSO, W., 2014. Bovine besnoitiosis emerging in central-eastern Europe, Hungary. In : *Parasit Vectors*. 2014. Vol. 7, n° 1, p. 20.

JACQUIET, P., BOUCHER, C. et LIENARD, E., 2009. La besnoitiose bovine : enquêtes sérologiques dans le sud-ouest de la France. In : *Journées nationales GTV. Recueil conférences*. Nantes. 2009.

JANITSCHKE, K., DE VOS, A.J. et BIGALKE, R.D., 1984. Serodiagnosis of bovine besnoitiosis by ELISA and immunofluorescence tests. In : *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 1984. Vol. 51, n° 4, p. 239-243.

KASSAI, T., CORDERO DEL CAMPILLO, M., EUZEBY, J., GAAFAR, S., HIEPE, T. et HIMONAS, C.A., 1988. Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). In : *Veterinary Parasitology*. 1988. Vol. 29, n° 4, p. 299-326.

KNOBIL, E. et NEILL, J., 1988. The reproductive systems - The male. In : *The Physiology of reproduction*. 2E 2DITON. New York : Raven Press.

KUMI-DIAKA, J., WILSON, S., SANUSI, A., NJOKU, C.E. et OSORI, D.I., 1981. Bovine besnoitiosis and its effect on the male reproductive system. In : *Theriogenology*. 1981. Vol. 16, n° 5, p. 523-530.

LEGRAND, P., 2003. La besnoitiose bovine en Ariège. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

LENFANT, F., 2013. Mise au point d'une technique de diagnostic sérologique par immunofluorescence indirecte de la Besnoitiose bovine à *Besnoitia besnoiti*. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

LESSER, M., BRAUN, U., DEPLAZES, P., GOTTSTEIN, B., HILBE, M. et BASSO, W., 2012. [First cases of besnoitiosis in cattle in Switzerland]. In : *Schweizer Archiv Für Tierheilkunde*. 2012. Vol. 154, n° 11, p. 469-474.

LIENARD, E., 2012. Blurred epidemiology on bovine besnoitiosis: DNA detection in skin among seropositive animals. In : *International Meeting on Apicomplexan Parasites in Farm Animals*. ApiCowPlexa Symposium. Lisbon. 2012.

LIENARD, E., SALEM, A., GRISEZ, C., PREVOT, F., BERGEAUD, J.P., FRANC, M., GOTTSTEIN, B., ALZIEU, J.P., LAGALISSE, Y. et JACQUIET, P., 2011. A longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a dairy cattle farm of southwest France. In : *Veterinary Parasitology*. 2011. Vol. 177, n° 1-2, p. 20-27.

MEHLHORN, H., KLIMPEL, S., SCHEIN, E., HEYDORN, A.O., AL-QURAI SHY, S. et SELMAIR, J., 2009. Another African disease in Central Europa: Besnoitiosis of cattle.

I. Light and electron microscopical study. In : *Parasitology Research*. 2009. Vol. 104, n° 4, p. 861-868.

MEMON, M.A., 2007. Common causes of male dog infertility. In : *Theriogenology*. 2007. Vol. 68, n° 3, p. 322-328.

NEUMAN, M., 1972. Serological survey of *Besnoitia besnoiti* (Marotel 1912) infection in Israel by immunofluorescence. In : *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*. 1972. Vol. 19, n° 5, p. 391-396.

PETER, J., 2007. CHAPTER 30 - Clinical Reproductive Physiology and Endocrinology of Bulls. In : *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2e édition. Philadelphia, Saunders : CHENOWETH et KASTELIC, J.P. p. 221-228.

PICARD-HAGEN, N. et BERTHELOT, X., 2011. L'infertilité du taureau : approche pratique. In : *Le Nouveau Praticien Vétérinaire, élevage et santé*. 2011. Vol. 4, n° 18, p. 15-22.

POPESKO, P., 1972. *Atlas d'anatomie topographique des animaux domestiques*. S.I. : Vander.

RICKARD, J.P., PINI, T., SOLEILHAVOUP, C., COGNIE, J., BATHGATE, R., LYNCH, G.W., EVANS, G., MAXWELL, W.M.C., DRUART, X. et DE GRAAF, S.P., 2014. Seminal plasma aids the survival and cervical transit of epididymal ram spermatozoa. In : *Reproduction*. 2014. Vol. 148, n° 5, p. 469-478.

RIGAL, F., 2008. Comparaison de la qualité de la semence de taureaux collectés à l'électro-éjaculateur ou au vagin artificiel. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

ROSS, A.D. et ENTWISTLE, K.W., 1979. The effect of scrotal insulation on spermatozoal morphology and the rates of spermatogenesis and epididymal passage of spermatozoa in the bull. In : *Theriogenology*. 1979. Vol. 11, n° 2, p. 111-129.

RYAN, E.G., LEE, A., CARTY, C., O'SHAUGHNESSY, J., KELLY, P., CASSIDY, J. P., SHEEHAN, M., JOHNSON, A. et DE WAAL, T., 2016. Bovine besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in an Irish dairy herd. In : *Veterinary Record*. 2016.

SAEED, S., KHAN, F.A., KHAN, D.A., NAVEED, A.K. et AHMAD, M., 1994. Demonstration of the site of obstruction in azoospermia by biochemical markers. In : *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*. 1994. Vol. 44, n° 6, p. 140-142.

SAINT-DIZIER, M. et CHASTANT-MAILLARD, S., 2014. Chapitre 5 : Le testicule. In : La reproduction animale et humaine. In : *La reproduction animale et humaine*. Quae. Synthèses. S.I. : s.n.

SCHARES, G., BASSO, W., MAJZOUB, M., ROSTAHER, A., SCHARR, J.C., LANGENMAYER, M.C., SELMAIR, J., DUBEY, J.P., CORTES, H.C., CONRATHS, F.J. et GOLLNICK, N.S., 2010. Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against

Besnoitia besnoiti tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. In : *Veterinary Parasitology*. 2010. Vol. 171, n° 1-2, p. 32-40.

THOMAS, C., 2007. La besnoitiose bovine : données bibliographiques. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

VOGLER, C.J., SAACKE, R.G., BAME, J.H., DEJARNETTE, J.M. et MCGILLIARD, M.L., 1991. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. In : *Journal of Dairy Science*. 1991. Vol. 74, n° 11, p. 3827-3835.

WAITES, G.M.H., ORTAVANT, R., BURE, A. et CORNU, C., 1968. Effets précoces d'une brève élévation de la température testiculaire sur la spermatogénèse du Bélier. In : *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. EDP Sciences. S.l. : s.n. p. 323-331.

WALDNER, C.L., KENNEDY, R.I. et PALMER, C.W., 2010. A description of the findings from bull breeding soundness evaluations and their association with pregnancy outcomes in a study of western Canadian beef herds. In : *Theriogenology*. 2010. Vol. 74, n° 5, p. 871-883.

WILLETT, E.L. et OHMS, J.I., 1957. Measurement of Testicular Size and its Relation to Production of Spermatozoa by Bulls. In : *Journal of Dairy Science*. 1957. Vol. 40, n° 12, p. 1559-1569.

Annexes

I. Annexe I : Tableau décrivant les caractéristiques générales des 40 taureaux

Identification du taureau	Race	Âge (années)	Note d'état corporel	Circonférence scrotale (cm)
0089	Charolais	3,96	Nd	39
0477	Charolais	3,62	3,5	40
3628	Limousin	1,60	2,5	35
1310	Charolais	2,82	Nd	41
0103	Charolais	3,89	Nd	40
0411	Charolais	3,42	3,7	41,5
8877	Limousin	3,34	3,5	35
5109	Charolais	1,65	3,2	35
6314	Limousin	4,48	4	37,5
0434	Charolais	3,68	Nd	40
1524	Charolais	2,69	3,5	44,5
6050	Blond d'aquitaine	3,37	3	37,5
9704	Charolais	1,46	3	34,5
9507	Charolais	4,69	3,5	44,5
1293	Charolais	6,44	3,7	38
2935	Charolais	1,98	Nd	40
8853	Limousin	4,29	3,5	36
1781	Limousin	6,12	3,5	38,5
5085	Limousin	6,60	4	42
8449	Limousin	2,13	3	38,5
1193	Angus	3,40	Nd	43
1257	Limousin	4,95	3	40
8776	Limousin	1,94	3,5	39
9880	Limousin	8,47	3,5	45
0542	Limousin	7,48	4	37
1570	Limousin	1,70	3,5	38
4692	Limousin	1,98	3	36
3894	Abondance	1,54	3	36
0492	Charolais	6,48	4	43
2216	Charolais	1,57	3	41
2594	Charolais	1,69	2,5	41
1389	Charolais	5,65	3	43
1690	Charolais	2,73	3,5	38,5
9216	Charolais	2,59	3	35,5
4309	Limousin	4,79	4	39
7030	Limousin	5,79	3,5	37
7054	Charolais	1,69	3	37
1544	Charolais	5,38	3,2	39,5
7037	Limousin	2,70	3,7	Nd
7494	Charolais	6,35	4	38

Nd : non disponible

II. Annexe II : Tableau décrivant le statut des 40 taureaux vis-à-vis de la besnoitiose

Identification du taureau	Sérologies			qPCR cutanée	Statut vis-à-vis de la besnoitiose
	Western Blot	ELISA Prionics	ELISA IDVet		
0089	Positif	Positif	Positif	Négatif	Séropositif sans signe clinique
0477	Positif	Positif	Positif	Négatif	Séropositif sans signe clinique
3628	Négatif	Positif	Négatif	Négatif	Séronégatif
1310	Positif	Positif	Positif	23.53	Séropositif sans signe clinique
0103	Positif	Positif	Positif	Négatif	Séropositif avec signes cliniques
0411	Positif	Positif	Positif	Négatif	Séropositif avec signes cliniques
8877	Positif	Positif	Positif	Négatif	Séropositif sans signe clinique
5109	Négatif	Positif	Négatif	Négatif	Séronégatif
6314	Positif	Positif	Positif	Négatif	Séropositif sans signe clinique
0434	Positif	Positif	Positif	37.73	Séropositif sans signe clinique
1524	Positif	Positif	Positif	27.08	Séropositif avec signes cliniques
6050	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Séronégatif
9704	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Séronégatif
9507	Positif	Positif	Positif	38.10	Séropositif sans signe clinique
1293	Positif	Positif	Positif	Négatif	Séropositif sans signe clinique
2935	Positif	Positif	Positif	16.64	Séropositif avec signes cliniques
8853	Positif	Positif	Positif	36.80	Séropositif sans signe clinique
1781	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Séronégatif
5085	Positif	Positif	Positif	Négatif	Séropositif sans signe clinique
8449	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Séronégatif
1193	Positif	Positif	Positif	27.55	Séropositif sans signe clinique
1257	Positif	Positif	Positif	Négatif	Séropositif avec signes cliniques
8776	Positif	Positif	Positif	24.34	Séropositif sans signe clinique
9880	Positif	Positif	Positif	Négatif	Séropositif avec signes cliniques
0542	Positif	Positif	Positif	38.83	Séropositif sans signe clinique
1570	Négatif	Négatif	Négatif	35.22	Séronégatif
4692	Négatif	Positif	Négatif	Négatif	Séronégatif
3894	Négatif	Négatif	Négatif	39.67	Séronégatif
0492	Positif	Positif	Positif	34.53	Séropositif sans signe clinique
2216	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Séronégatif
2594	Positif	Positif	Positif	Négatif	Séropositif avec signes cliniques
1389	Positif	Positif	Positif	Négatif	Séropositif sans signe clinique
1690	Positif	Positif	Positif	23.89	Séropositif avec signes cliniques
9216	Positif	Positif	Positif	27.02	Séropositif avec signes cliniques
4309	Positif	Positif	Positif	20.52	Séropositif avec signes cliniques
7030	Positif	Positif	Positif	33.31	Séropositif avec signes cliniques
7054	Négatif	Négatif	Négatif	35.61	Séronégatif
1544	Positif	Positif	Positif	20.86	Séropositif avec signes cliniques
7037	Positif	Positif	Positif	35.56	Séropositif sans signe clinique
7494	Positif	Positif	Positif	32.41	Séropositif sans signe clinique

III. Annexe III : Tableau décrivant les lésions génitales des 40 taureaux

Identification du taureau	Lésions génitales	Classification des lésions génitales
0089	<u>Absence</u>	Absentes
0477	<u>Absence</u>	Absentes
3628	<u>Absence</u>	Absentes
1310	<u>fibrose testiculaire modérée</u> , lésions scrotales,	Modérées
0103	<u>Abcès scrotaux</u> , hyperkératose scrotale sévère	Sévères
0411	<u>Hyperkératose scrotale sévère</u> , lésions scrotales, fibrose testiculaire légère	Sévères
8877	<u>Fibrose testiculaire légère</u>	Absentes
5109	<u>Absence</u>	Absentes
6314	<u>Absence</u>	Absentes
0434	<u>Fibrose testiculaire modérée</u>	Modérées
1524	<u>Dégénérescence testiculaire unilatérale</u> , induration épидидymaire, <u>hyperkératose scrotale modérée</u>	Sévères
6050	<u>Absence</u>	Absentes
9704	<u>Absence</u>	Absentes
9507	<u>Absence</u>	Absentes
1293	<u>Fibrose testiculaire modérée</u> , induration testiculaire unilatérale	Modérées
2935	<u>Hyperkératose scrotale sévère</u> , Fibrose testiculaire modérée	Sévères
8853	<u>Induration épидидymaire bilatérale</u>	Modérées
1781	<u>Kyste épидидymaire unilatéral</u>	Modérées
5085	<u>Fibrose testiculaire légère</u>	Absentes
8449	<u>Absence</u>	Absentes
1193	<u>Absence</u>	Absentes
1257	<u>Hyperkératose scrotale modérée</u>	Modérées
8776	<u>Absence</u>	Absentes
9880	<u>Hyperkératose scrotale légère</u>	Absentes
0542	<u>Fibrose testiculaire sévère</u>	Modérées
1570	<u>Fibrose testiculaire légère</u>	Absentes
4692	<u>Fibrose testiculaire légère</u> , verrue scrotale	Absentes
3894	<u>Absence</u>	Absentes
0492	<u>Fibrose testiculaire légère</u>	Absentes
2216	<u>Kyste épидидymaire bilatéral</u>	Sévères
2594	<u>Fibrose testiculaire modérée</u>	Modérées
1389	<u>Fibrose testiculaire légère</u>	Absentes
1690	<u>Hyperkératose scrotale modérée</u>	Modérées
9216	<u>Hyperkératose scrotale modérée</u>	Modérées
4309	<u>Hyperkératose scrotale sévère</u> , fibrose testiculaire modérée	Sévères
7030	<u>Fibrose testiculaire modérée</u>	Modérées
7054	<u>Fibrose testiculaire légère</u>	Absentes
1544	<u>Fibrose testiculaire légère</u>	Absentes
7037	<u>Fibrose testiculaire sévère</u> , induration épидидymaire, <u>lésions scrotales nombreuses</u>	Sévères
7494	<u>Fibrose testiculaire sévère</u>	Modérées

IV. Annexe IV : Tableau décrivant les paramètres séminologiques des 40 taureaux

Identification du taureau	Stim.	Vol.	Conc.	Quant.	Mot. ma.	Mot. ind.	Sch.	Mort.	An. tot.	An. têt.	An. p.i.	An. qu.
0089	20	2	0,179	0,358	3	55	0	39	19	11	4	5
0477	15	2,5	0,625	1,5625	4,5	80	0	26	14	4	4	6
3628	10	5,5	1,2	6,6	5	55	2	50	16,5	5	11	1
1310	14	8,5	0,105	0,8925	3,5	75	0	25	13	6	4	3
0103	30	5	0,04	0,2	1	50	0	74	19	7	2	10
0411	57	2	< 0,001	< 0,002	1	50	0	50	49	24	18	7
8877	17	5	0,65	3,25	5	80	0	100	5	5	0	0
5109	15	7	1,32	9,24	5	80	0	40	6	4	0	2
6314	17	3	0,325	0,975	5	75	0	100	16	5	4	7
0434	20	2	0,08	0,16	3	20	0	68	36	1	4	32
1524	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
6050	13	6	0,45	2,7	5	75	0	100	3	0	1	2
9704	42	9	0,033	0,297	2	70	0	100	37	5	28	5
9507	Nd	15	0,165	2,475	3,5	60	2	99	74	38	34	2
1293	18	2	0,09	0,18	2	75	0	18	15,5	6	4	6
2935	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
8853	15	14	0,5	7	5	70	0	19	12	2	2	8
1781	Nd	7	0,07	0,49	3	70	0	63	9,5	4	3	3
5085	12	8	0,275	2,2	4	80	0	23	8,5	4	3	2
8449	8	4,5	0,105	0,4725	5	85	0	37	21,5	7	6	9
1193	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
1257	24	2	0,08	0,16	2	75	1	37	25	10	8	7
8776	29	8	0,85	6,8	5	55	0	25	27,5	15	5	9
9880	26	3	0,285	0,855	4	55	0	48	8	4	2	3
0542	14	6	0,6	3,6	5	50	1	32	19	4	6	10
1570	5	8,5	0,5	4,25	5	80	2	15	5	0	3	2
4692	Nd	8	0,293	2,344	5	40	2	100	20	10	3	7
3894	3	4	0,08	0,32	4	40	0	22	4	2	1	1
0492	40	7	0,02	0,14	2	80	0	56	24,5	15	4	6
2216	Nd	11	0,065	0,715	4	60	1	30	66,5	6	56	5
2594	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
1389	51	5,5	0,397	0,255	2	20	3	54	7,5	1	0	7
1690	23	10	0,117	1,17	3	25	2	51	20,5	8	8	5
9216	13	9,5	0,0436	0,4142	2	60	0	16	5,5	2	1	3
4309	29	4	0,00674	0,02696	1	60	0	64	25	8	5	13
7030	46	8	0,0519	0,4152	2	35	0	36	17,5	8	5	6
7054	29	5,5	0,115	0,6325	4	60	1	53	20,5	8	9	5
1544	16	30,5	0,0816	2,4888	2	60	1	27	13,5	4	4	6
7037	20	1,5	0,164	0,246	4	45	2	23	32	19	4	10
7494	34	12	0,0534	0,6408	2	54	0	16	5,5	3	1	2

Légende :

Stim : Nombre de stimulations électriques nécessaires à l'éjaculation ; Vol. : Volume de l'éjaculat ; Conc. : Concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat (milliard/ml) ; Quant. : Quantité de spermatozoïdes calculée dans l'éjaculat (milliards) ; Mot. ma. : Motilité massale ; Mot. ind. : Motilité individuelle (%) ; Sch. : Test de Schalm ; Mort. : Taux de mortalité (%) ; An. tot. : Taux d'anomalies totales (%) ; An. têt. : Taux d'anomalies de tête (%) ; An. p.i. : Taux d'anomalie de pièce intermédiaire (%) ; An. qu. : Taux d'anomalie de queue (%)

AGREMENT SCIENTIFIQUE


En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Philippe JACQUIET, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **FLORENTIN Simon** intitulée « **La semence de taureaux infectés par *Besnoitia besnoiti* : moindre qualité et source de contamination ?** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 26 mai 2016
Professeur Philippe JACQUIET
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

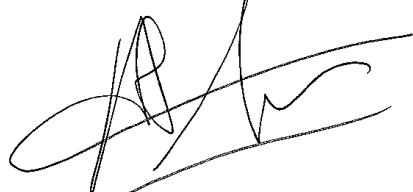


Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN

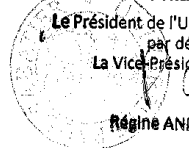


Pour la Direction et par délégation,
le Directeur de l'Enseignement
et de la Vie Étudiante
HUBERT BRUGÈRE

Vu :
Le Président du jury :
Professeur Alexis VALENTIN



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL



Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU
Régine ANDRE-OBRECHT

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Nom : FLORENTIN

Prénom : Simon

Titre : La semence de taureaux infectés par *Besnoitia besnoiti* : moindre qualité et source de contamination ?

Résumé : La besnoitiose bovine, due à *Besnoitia besnoiti*, est une maladie émergente dont la transmission par le sperme et l'effet sur la fonction sexuelle des taureaux sont encore méconnus.

L'objectif de cette thèse était de déterminer le rôle éventuel du sperme dans la transmission de la besnoitiose et les effets de la besnoitiose chronique sur la fonction sexuelle du taureau. La présence de l'ADN de *Besnoitia besnoiti* dans le sperme et/ou le liquide pré-spermatique de 40 taureaux, et la relation entre les statuts sérologiques, cliniques et séminologiques ont été évalués chez 11 taureaux non infectés, 17 taureaux infectés subcliniquement et 12 taureaux infectés cliniquement. Le sperme a été récolté par électroéjaculation sur 36 taureaux en septembre 2013, en région Provence-Alpes-Côte d'Azur où la besnoitiose est enzootique.

L'ADN du parasite n'a été mis en évidence par PCR quantitative dans aucun échantillon de sperme et/ou de liquide pré-spermatique des 40 taureaux. La transmission de *Besnoitia besnoiti* par le sperme semble donc très peu probable.

Les taureaux cliniquement infectés par *Besnoitia besnoiti* ont présenté plus d'altérations du tractus génital que les taureaux non infectés ou infectés subcliniques. Une relation entre le statut infectieux des taureaux vis-à-vis de la besnoitiose et la qualité du sperme a été mise en évidence, avec une moindre qualité séminologique chez les taureaux présentant des signes cliniques de besnoitiose. Une relation significative a également été notée entre les lésions génitales et la qualité séminologique. Cela signifie qu'en l'absence de signe clinique et de lésions génitales modérées à sévères, la besnoitiose chronique bovine a peu d'impact sur la qualité du sperme.

C'est la raison pour laquelle il est préférable de réformer les taureaux cliniquement atteints de besnoitiose sous sa forme chronique.

Mots-clés : besnoitiose - *Besnoitia besnoiti* - taureau - sperme - excrétion spermatique - fonction sexuelle - lésions génitales - électroéjaculation - sérologie - ELISA - Western Blot - PCR - qualité séminologique

Title: The bull semen infected by *Besnoitia besnoiti*: lower quality and source of contamination ?

Abstract: The bovine besnoitiosis, due to *Besnoitia besnoiti*, is an emerging disease for which the transmission through the semen and the effect on the sexual function of bulls are still unknown.

The aim of this thesis was to determine the role of semen in a putative sexual transmission of bovine besnoitiosis and the consequences of the chronic besnoitiosis on the sexual function of the bull. The presence of *Besnoitia besnoiti* DNA in the semen and/or the prespermatic fluid of 40 bulls, and the relationship between the serological, clinical and seminal status were evaluated in 11 uninfected, 17 subclinically infected and 12 clinically infected bulls. Semen of 36 bulls was collected by electroejaculation in September 2013, in the region of Provence-Alpes-Côte d'Azur, where the besnoitiosis is enzootic.

No *Besnoitia besnoiti* DNA was detected by quantitative real-time PCR in the semen and/or prespermatic fluid of the 40 bulls whatever the category of bulls. Consequently, the transmission of *Besnoitia besnoiti* by the semen seems to be unlikely in natural conditions.

Bulls clinically infected with *Besnoitia besnoiti* showed significantly more genital tract alterations than uninfected or subclinically infected bulls. A relationship between besnoitiosis infectious status and semen quality was evidenced, with a lower semen quality when bulls were clinically infected. Moreover, a significant relationship was noted between genital lesions and semen score. This means that in the absence of clinical signs and moderate to severe genital lesions, chronic bovine besnoitiosis is unlikely to alter semen quality.

That is why culling or separation of clinically infected bulls from the remaining healthy animals is strongly recommended.

Key words: besnoitiosis - *Besnoitia besnoiti* - bull - semen - spermatoc excretion - sexual function - genital lesions - electroejaculation - serology - ELISA - Western Blot - PCR - seminal quality