

ANNEE 2019 THESE : 2019 – TOU 3 – 4022

Adénocarcinome pulmonaire ovin : excrétion du virus dans le sperme et impact sur la fonction sexuelle des béliers

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

PERRIN Sophie

Née, le 21/09/1993 à Remiremont (88)

Directeur de thèse : Mme Nicole HAGEN-PICARD

JURY

PRESIDENT :

Mr Louis BUJAN

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Nicole HAGEN-PICARD
Mr Xavier BERTHELOT

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

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

DIRECTRICE | :

Madame Isabelle CHMITELIN

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- MME **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et
Thérapeutique* MME **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
MDELVERDIER **Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine
animale* MME **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
MME **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
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° CLASSE

- MME **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
MME **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
MME **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
MME **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*

PROFESSEURS CERTIFIES 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 **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*

MME **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
MME **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
MME **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

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*
MME **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
MME **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
MME **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
MME **FERRAN Aude**, *Physiologie*
MME **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
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*
MME **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
MME **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
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*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
MME **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

MME **BORDE DORE Laura**, *Médecine interne des équidés*
M. **GIANSETTO Thomas**, *Chirurgie*
M. **JOLIVET Franck**, *Médecine interne*
MME **LECRU Line**, *Dermatologie*
M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
MME **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

MME **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

Remerciements

Aux membres du jury de thèse,

A Monsieur le Professeur Louis BUJAN,

Professeur des Universités,
Praticien hospitalier,
Andrologie – Biologie de la reproduction
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.
Hommages respectueux.

A Madame le Professeur Nicole HAGEN-PICARD,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Pathologie de la reproduction
Qui a proposé cette étude et accepté la direction du travail.
Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Xavier BERTHELOT,

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie de la reproduction
Qui a collaboré à cette étude et a aimablement accepté de faire partie du jury de cette thèse.
Sincères remerciements.

Aux personnes ayant aidé à l'aboutissement de cette thèse,

A Madame le Docteur Patricia RONSIN,

Pour votre participation aux manipulations, pour la lecture des lames et pour avoir aimablement accepté cette invitation.

A Monsieur Luc RIVES,

Directeur d'OVILOT,
Pour votre convivialité, pour votre accueil lors des manipulations et pour avoir aimablement accepté cette invitation.

Au Docteur Caroline LEROUX,

Equipe "Physiopathologie, rétrovirus et tumeurs rares"
UMR754 "Infections Virales et Pathologie Comparée" INRA UCBL EPHE
Pour son aide dans la rédaction, sa relecture attentive et son implication.

Je dédie ce travail, ces années d'études et ce rêve d'enfant accompli à mes grands parents Yvette et Adrien. « Tu n'es plus là où tu étais, mais tu es partout là où je suis » Victor Hugo.

A mes parents, pour votre soutien et votre amour. Merci d'avoir toujours été présents, j'espère vous rendre fiers. Je vous aime.

A mon frère, pour qui je déplacerais des montagnes.

A Valentin, pour tout ton amour, ta patience et ta présence.

A Thomish, le meilleur ami de toute une vie.

Aux personnes qui me sont si chères, Emilie, Cédric, Fabien, Vincent, Clément, Blandine, Kévin, Laetitia et Etienne.

Table des matières

INTRODUCTION : ADENOCARCINOME PULMONAIRE OVIN EN OCCITANIE	15
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
1. <i>Jaagsiekte Sheep Retrovirus</i> et l'adénocarcinome pulmonaire ovin (pour revues, Suau et al., 2006 ; Leroux et Mornex, 2008 ; Leroux et al, 2010 ; Monot et al., 2015).....	17
2. Anatomie de l'appareil génital du bélier (Barone, 1990).....	20
2.1 Le pénis	21
2.2 Les testicules	22
2.3 Les épидидymes.....	23
2.4 La vascularisation des testicules et des épидидymes	24
3. La production de sperme	25
3.1 La spermatogenèse	25
3.2 Composition du sperme.....	26
3.2.1 Le plasma séminal	27
3.2.2 Les spermatozoïdes	28
4. Evaluation de la fonction sexuelle du bélier.....	29
4.1 Examen clinique de l'appareil génital externe	29
4.1.1 Inspection et palpation de l'appareil génital externe	29
4.1.2 Mesure de la circonférence scrotale	29
4.1.3 Examen échographique de l'appareil génital mâle.....	30
4.2 Protocole de récolte de sperme et de l'évaluation de sa qualité	33
4.2.1 La récolte de sperme.....	33
4.2.2 Examen séminologique	34
PARTIE EXPERIMENTALE.....	36
1. Matériels et méthodes.....	36
1.1 Présentation des élevages	36
1.2 Description des animaux	36

1.3 Examen général	38
1.4 Examen de l'appareil génital	39
1.5 Récolte de la semence	39
1.6 Détermination de la présence du virus de l'adénocarcinome pulmonaire dans le sperme	41
1.7 Examen séminologique	41
1.8 Réalisation et lecture des frottis	42
1.9 Analyses statistiques.....	43
2. Résultats et discussion.....	44
2.1 Présence du virus JSRV dans le sperme des béliers	44
2.2 Etat d'engraissement des béliers	44
2.3 Lésions de l'appareil génital.....	45
2.4 Circonférence scrotale	47
2.5 Qualité de la semence.....	49
2.5.1 Volume de l'éjaculat.....	49
2.5.2 Motilité individuelle	50
2.5.3 Concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat	52
2.5.4 Nombre de spermatozoïdes par éjaculat.....	52
2.5.5 Taux de viabilité des spermatozoïdes.....	53
2.5.6 Anomalies spermatiques.....	55
2.5.7 Score séminologique	58
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES SUR LE CONTROLE DE L'INFECTION PAR LE JSRV ..	61

Table des illustrations :

Figures :

Figure 1 : La famille des *Retroviridae*

Figure 2 : Organisation génomique du provirus JSRV

Figure 3 : Représentation schématique de l'anatomie de l'appareil uro-génital d'un bélier (Vue latérale gauche, d'après Barone, 1990)

Figure 4 : Représentation schématique d'une vue caudale du testicule et de l'épididyme gauche d'un taureau (d'après Barone, 1990)

Figure 5 : Schéma d'un spermatozoïde (d'après Dellman, 1998)

Figure 6 : Schéma d'un vagin artificiel (d'après Barret, 1992)

Figure 7 : Influence de la méthode de collecte et de la classe d'âge des 72 béliers sur le volume moyen de sperme récolté (en mL)

Figure 8 : Influence de la méthode de collecte et de la classe d'âge des 72 béliers sur la motilité individuelle moyenne des spermatozoïdes (en pourcentage)

Figure 9 : Influence de la méthode de collecte et de la classe d'âge des 72 béliers sur la concentration moyenne en spermatozoïdes (en milliards par mL)

Figure 10 : Influence de la méthode de collecte et de la classe d'âge des 72 béliers sur le nombre moyen de spermatozoïdes par éjaculat (en milliards)

Figure 11 : Influence de la méthode de collecte et de la classe d'âge des 72 béliers sur le pourcentage de spermatozoïdes vivants

Figure 12 : Influence de la méthode de collecte et de la classe d'âge des 72 béliers sur le pourcentage d'anomalies spermatiques

Figure 13 : Répartition des 72 béliers selon leur score séminologique et leur statut vis-à-vis de JSRV

Figure 14 : Répartition des 72 béliers en fonction du score séminologique et de la méthode de collecte, pour chaque classe d'âge

Graphiques :

Graphique 1 : Circonférences scrotales (CS) des 76 béliers (en cm) en fonction de leur âge (en années). Statut JSRV: positif (●), négatif (◇) Les seuils de CS normale en fonction de l'âge sont indiqués en rouge

Images échographiques :

Image échographique 1 : Coupe longitudinale d'un testicule

Image échographique 2 : Coupes longitudinales de testicules présentant des lésions de calcification, importantes à gauche et rares sur le testicule droit

Photographies :

Photographie 1 : Mesure de la circonférence scrotale sur un bélier

Photographie 2 : Béliers Causses du Lot participant à l'étude

Photographie 3 : L'électroéjaculateur ElectroJac5 utilisé pour les récoltes de semence

Photographie 4 : Collecte de sperme à l'électroéjaculateur sur un bélier

Photographie 5 : Bélier atteint d'une balanoposthite, le gland et le prépuce sont rouges

Photographie 6 : Image microscopique de trois spermatozoïdes morts et un vivant (x 100)

Photographie 7 : Image microscopique d'un spermatozoïde anormal : tête seule (x 40)

Photographie 8 : Image microscopique d'un spermatozoïde anormal : présence d'une pièce intermédiaire double (x 100)

Tableaux :

Tableau 1 : Principales caractéristiques de la production spermatique, chez les principales espèces domestiques (d'après Hanzen, 2014)

Tableau 2 : Description de la composition de la semence chez le bélier (d'après Cupps, 1991)

Tableau 3 : Détermination du potentiel reproducteur du bélier en fonction de sa circonférence scrotale donnée en centimètres (d'après Van Metre, 2012)

Tableau 4 : Répartition des béliers de l'étude en fonction de leur classe d'âge

Tableau 5 : Grille de classification de la note d'état corporel chez les ovins (d'après Scott, 2001)

Tableau 6 : Motilité massale en fonction des observations microscopiques

Tableau 7 : Classification de la semence en fonction du score sémiologique (Kimberling et al., 1997, Ott et al., 1980, Van Metre et al., 2012)

Tableau 8 : Nombre de béliers dont le sperme contient du JSRV ou atteint cliniquement d'adénocarcinome pulmonaire, par élevage

Tableau 9 : Lésions de l'appareil génital dans la cohorte étudiée des 79 béliers, en fonction de leur statut JSRV

Tableau 10 : Paramètres séminologiques des 72 béliers (Moyenne \pm ET), médiane et étendue

Tableau 11 : Anomalies des spermatozoïdes dans les éjaculats collectés sur les 72 béliers et statut JSRV

Liste des abréviations :

ADN : Acide desoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BTV-8 : *Blue Tongue Virus* sérotype 8

CAEV : *Caprine Arthritis Encephalitis Virus*

CIA : Centre d'insémination artificielle

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

enJSRV : endogenous *Jaagsiekte Sheep RetroVirus*

ENTV : *Enzootic nasal tumor virus*

GAEC : Groupement agricole d'exploitation en commun

GDS : Groupement de défense sanitaire

GTV : Groupement technique vétérinaire

IA : Insémination artificielle

INRA : Institut national de la recherche agronomique

JSRV : *Jaagsiekte Sheep RetroVirus*

LTR : Long Terminal Repeat

L1-L2-L3 : Vertèbres lombaires 1, 2 et 3

OIE : Office international des épizooties

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : Polymerase chain reaction

SCI : Station de contrôle individuel

SRLV : Small ruminant lentivirus

S3 : Vertèbre sacrale 3

VIH : *Virus de l'immunodéficience humaine*

INTRODUCTION : ADENOCARCINOME PULMONAIRE OVIN EN OCCITANIE

Le rétrovirus JSRV (Jaagsiekte Sheep Retrovirus) est responsable du développement d'une tumeur contagieuse du poumon des moutons (et rarement chez les chèvres), appelée adénocarcinome pulmonaire ovin (pour revue, Leroux et Mornex, 2008, Monot et al., 2015). Cette affection a été décrite pour la première fois en Afrique du Sud à la fin du XIX^{ième} siècle. Aujourd'hui, la maladie est présente dans de nombreuses régions du Monde (OIE, 2008).

Il s'agit de la tumeur pulmonaire la plus fréquente du mouton (OIE, 2008). La maladie se caractérise par la transformation tumorale de cellules de l'épithélium pulmonaire soit des pneumocytes de type II dans l'alvéole soit des cellules Club dans la bronchiole pulmonaire. Les symptômes sont caractérisés par un essoufflement, une perte de poids et un écoulement mucoïde provenant des poumons. L'infection évolue vers la mort de l'individu par détresse respiratoire.

Situation sanitaire vis-à-vis de l'adénocarcinome pulmonaire ovin en Occitanie :

La région Occitanie est la première région de production ovine de France avec 21% du cheptel national soit plus de 700 000 brebis, et l'adénocarcinome pulmonaire est présent, notamment dans le département du Lot. La difficulté de mise en place d'actions collectives ne permet ni de connaître la prévalence de la maladie ni d'envisager son éradication. C'est pourquoi, depuis 2009, dans le Lot, l'organisme de sélection de la race ovine Causse du Lot (OVILOT), en association avec le GDS 46, le Conseil Général du Lot et le GTV 46, a mis en place une surveillance sanitaire des élevages adhérents, en collaboration avec l'équipe PR2T (Physiopathologie, Rétrovirus, Tumeurs Rares de l'UMR754 IVPC (Infections Virales et Pathologie Comparée) INRA-Université Lyon 1- EPHE de Lyon. Cette surveillance a porté sur 34 élevages sélectionneurs, représentant 24 838 brebis en 2013. Des autopsies (trois par an et par élevage) ont été réalisées sur des animaux présentant un amaigrissement chronique. Le diagnostic d'adénocarcinome pulmonaire a été posé sur 98 animaux sur 171 (57%) à partir de l'identification de lésions histopathologiques pathognomoniques des poumons. Ainsi, entre 2011 et 2014, 72% des 29 élevages de la base de sélection d'OVILOT, ayant pratiqué des autopsies, présentaient au moins une brebis ayant des lésions histopathologiques compatibles avec l'adénocarcinome pulmonaire.

Depuis 2012, la prévalence d'adénocarcinome pulmonaire ovin sur les lots d'agnelles, issus des élevages sélectionneurs, commercialisés par OVILOT est élevée, de 11 % (54 lots sur 542). Cinq des 34 élevages (15 %) sélectionneurs sont atteints.

Le rétrovirus JSRV a été détecté chez des béliers issus de la SCI (Station de Contrôle Individuel) et du CIA (Centre d'Insémination Artificielle) d'OVILOT. La SCI reçoit les 90 meilleurs jeunes béliers des élevages sélectionneurs, élevés en station pendant six mois. Ils

sont ensuite répartis entre le CIA et des élevages multiplicateurs. En 2014, 3,3% des béliers de la SCI ont été éliminés car ils présentaient des signes cliniques évocateurs d'adénocarcinome pulmonaire. La présence de l'adénocarcinome en centre d'insémination constitue un risque majeur de diffusion de la maladie dans les élevages du département, notamment si le virus est présent dans le sperme. En outre, selon l'Arrêté du 30 Mars 1994 (Legifrance, 1994), pour avoir un agrément sanitaire, les centres d'inséminations ovins doivent utiliser, pour la monte publique artificielle, des béliers indemnes de tout signe clinique d'adénocarcinome pulmonaire depuis plus de trois ans.

Les mesures sanitaires pour maîtriser l'extension de l'adénocarcinome pulmonaire dans les élevages ne peuvent pas être basées que sur le dépistage de la maladie et sur l'élimination des animaux infectés. L'objectif serait de faire entrer dans des centres de regroupement d'animaux, tels que le CIA, que des animaux indemnes. Il faudrait pour cela contrôler le statut des futurs reproducteurs et des troupeaux naisseurs. Mais, à ce jour, il n'existe pas de test permettant un dépistage à grande échelle et en routine, ce qui rend difficile la maîtrise de cette affection.

Par ailleurs, la mise en évidence du génome du virus dans le sperme pose la question de son impact éventuel sur la qualité de la semence et la fertilité des béliers. C'est pourquoi, OVILOT en partenariat avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse et l'équipe PR2T de Lyon, a initié une étude dans des troupeaux infectés, visant à évaluer la relation entre l'infection par le JSRV (déterminée par PCR sur le sperme) et la qualité de la semence des béliers. Cette étude à laquelle j'ai participé a fait l'objet de ma thèse vétérinaire.

Dans une première partie bibliographique, j'ai présenté l'adénocarcinome pulmonaire ovin, lié au rétrovirus JSRV et l'examen de la fonction sexuelle du bélier. Dans une deuxième partie, l'étude expérimentale est décrite et les résultats obtenus sont discutés et mis en perspective.

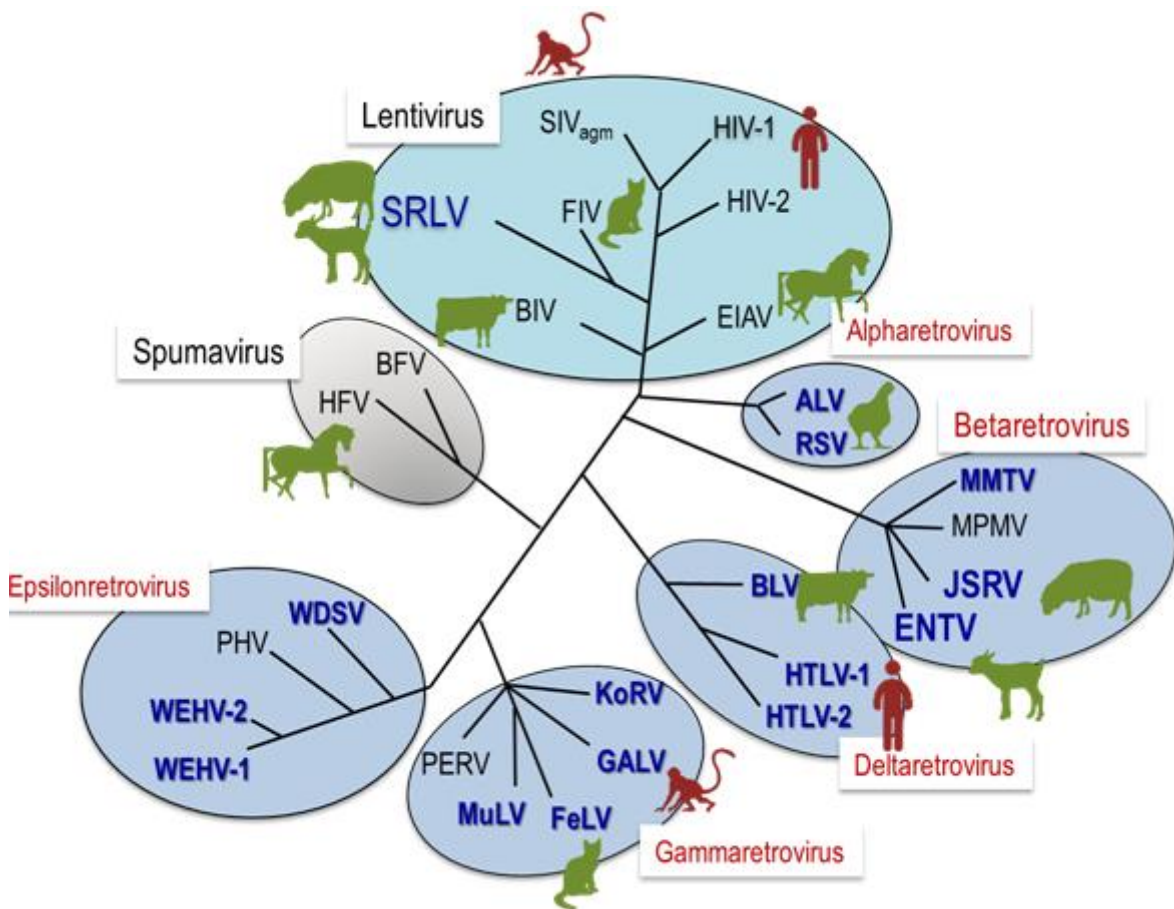
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Jaagsiekte Sheep Retrovirus* et l'adénocarcinome pulmonaire

ovîn (pour revues, Suau et al., 2006 ; Leroux et Mornex, 2008 ; Leroux et al, 2010 ; Monot et al., 2015)

Le JSRV est un rétrovirus oncogène, du genre β -rétrovirus dans la famille des Retroviridae qui infecte les petits ruminants domestiques. Les *Retroviridae* sont des virus à ARN, enveloppés, dont la réplication dépend de la reverse transcriptase (RT), une ADN-polymérase ARN dépendante. Ils infectent de nombreux vertébrés, avec notamment HIV (Human Immunodeficiency Virus) responsable du SIDA chez l'homme (Figure 1).

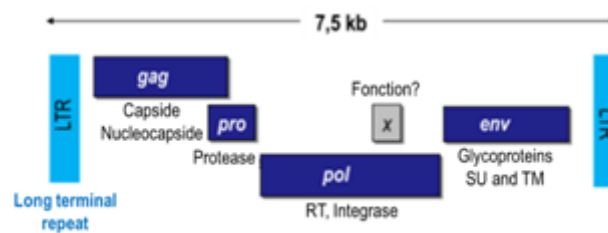
Figure 1 : La famille des *Retroviridae*



L'organisation du génome de JSRV est typique d'un rétrovirus (figure 2), avec les gènes *gag* codant les protéines de la capsid, codant une protéase responsable de la maturation des précurseurs protéiques viraux, *pol* (qui code pour la reverse transcriptase et l'intégrase) et *env* (qui code pour les glycoprotéines de l'enveloppe, soit SU (Surface) et TM

(TransMembranaire) qui en association avec des composants de membrane cellulaire forment l'enveloppe virale des particules matures) (Monot et al., 2015 ; Hofacre et Fan, 2010). JSRV possède un cadre de lecture ouvert « x », qui chevauche le gène *pol* et qui code une protéine de 166 acides aminés dont la fonction est actuellement indéterminée. Le génome proviral, situé entre deux régions LTR terminales, est intégré au génome cellulaire (Suau et al., 2006). Lors du cycle rétroviral, le génome viral est intégré au génome cellulaire *via* les régions terminales LTR (Long Terminal Repeat). L'intégration du génome rétroviral dans le génome de l'hôte est une étape essentielle du cycle rétroviral et résulte en la persistance du virus dans les cellules de l'hôte tout au long de sa vie.

Figure 2 : Organisation génomique du provirus JSRV



JSRV est un rétrovirus oncogène, capable d'induire un cancer. Le pouvoir oncogénique est porté par l'enveloppe virale capable de transformer les cellules épithéliales pulmonaires en dérégulant la machinerie cellulaire (Monot et al., 2015). La présence de ce virus chez la brebis Dolly, premier mammifère à avoir été cloné, a conduit en 2003 à son euthanasie (Suau et al., 2006). Le virus JSRV est apparenté à l'*enzootic nasal tumor virus* (ENTV), responsable de tumeur de l'éthmoïde chez les petits ruminants (Monot et al., 2015).

Outre les virus exogènes JSRV responsables de l'induction de cancer, les génomes des chèvres et moutons hébergent des séquences rétrovirales endogènes ou ERV (Endogenous Retrovirus) de JSRV, enJSRV (Carlson et al. 2004). Ils résultent de l'intégration ancestrale de rétrovirus exogène dans l'ADN de cellules germinales des hôtes. Ces séquences enJSRV sont transmises comme des gènes mendéliens et présentes à de multiples copies dans les chromosomes de moutons et chèvres. Ils sont génétiquement apparentés aux formes exogènes de JSRV, les enJSRV ne sont pas impliqués dans le cancer mais nécessitent la mise au point de méthodes discriminantes pour la détection moléculaire de JSRV.

JSRV et induction de l'adénocarcinome pulmonaire

JSRV interagit avec la cellule *via* HYAL (Hyaluronidase type 2), une molécule ubiquitaire exprimée à la surface de nombreuses cellules. JSRV se réplique activement uniquement dans les cellules épithéliales pulmonaires, mais les macrophages et les cellules mononucléées du sang périphérique (principalement les monocytes et les lymphocytes B et T) sont infectés et le génome viral est détectable dans les nœuds lymphatiques ou les tissus lymphoïdes, (Leroux et Mornex, 2008). L'expression virale est limitée aux cellules épithéliales bronchiolaires et

alvéolaires. L'enveloppe du rétrovirus, qui interagit avec le récepteur en surface des cellules, et les régions LTR, qui contrôlent la réplication virale, sont des déterminants majeurs du tropisme cellulaire et de la spécificité de réplication. Ainsi, les régions régulatrices LTR de JSRV ont des sites de liaisons spécifiques avec des facteurs de transcription présents dans les cellules épithéliales pulmonaires, tels que HNF3 (Hepatocyte Nucleat Factor 3) (pour revue, Monot et al., 2015).

Comme les autres rétrovirus, JSRV est responsable d'une infection persistante. Celle-ci s'explique par l'intégration obligatoire du génome viral dans le génome de l'hôte lors du cycle viral. Une fois intégré, le génome viral sera transmis aux cellules filles lors de la division cellulaire. La transmission des particules virales JSRV se fait principalement par voie aérienne via des particules aérosolisées (Suau et al., 2006). Le confinement des animaux favorise le risque de transmission entre les individus.

Dans les conditions d'élevage, des agneaux issus de mères porteuses de JSRV sont contaminés comme le montre la détection de génome viral à la naissance, ce qui suggère qu'il pourrait y avoir une transmission périnatale ou *in utero* (Caporale et al., 2005). JSRV se transmet également via le lait et le colostrum (Grego et al., 2008). Récemment, l'équipe PR2T du Dr Leroux a mis en évidence la présence de génome de JSRV dans la semence de béliers (manuscrit en préparation), suggérant une possible transmission par voie sexuelle, comme cela a été montré pour d'autres rétrovirus, dont HIV.

Diagnostique virologique et clinique de JSRV et des cancers induits

L'adénocarcinome induit par JSRV est mis en évidence essentiellement lors d'exams cliniques, avec l'observation d'un écoulement nasal associé à des signes respiratoires à l'auscultation. A l'autopsie, des lésions macroscopiques pulmonaires peuvent être observées et seront confirmées lors d'un examen histopathologique.

Il n'existe actuellement pas de diagnostic de routine permettant la mise en évidence de l'infection par JSRV. Cependant des outils ont été développés dans le contexte de recherche, notamment par l'équipe PR2T du Dr C. Leroux, à Lyon. Basés sur des approches moléculaires, ces outils permettent la mise en évidence du génome ARN (particules infectieuses) ou ADN (génome viral intégré) par des RT-PCR ou PCR utilisant des amorces strictement spécifiques des formes exogènes de JSRV. Ces techniques moléculaires permettent la détection du génome viral à partir de tissus, ou de tout prélèvement biologique (lait, sang, lavage bronchoalvéolaire, jetage, semence...).

Les défenses immunitaires vis-à-vis de l'infection par le JSRV sont actuellement mal connues, il ne semble pas y avoir de réponse immunitaire humorale. Cette tolérance vis-à-vis du JSRV serait peut-être due à l'existence d'une forme endogène (enJSRV). Cependant, des essais de vaccination contre le JSRV chez des moutons ont montré l'existence d'une réponse cellulaire et humorale spécifique. La détection des anticorps sériques dirigés contre la protéine de capsid du virus a été développée (Leroux, et al., manuscrit en préparation). Ces anticorps

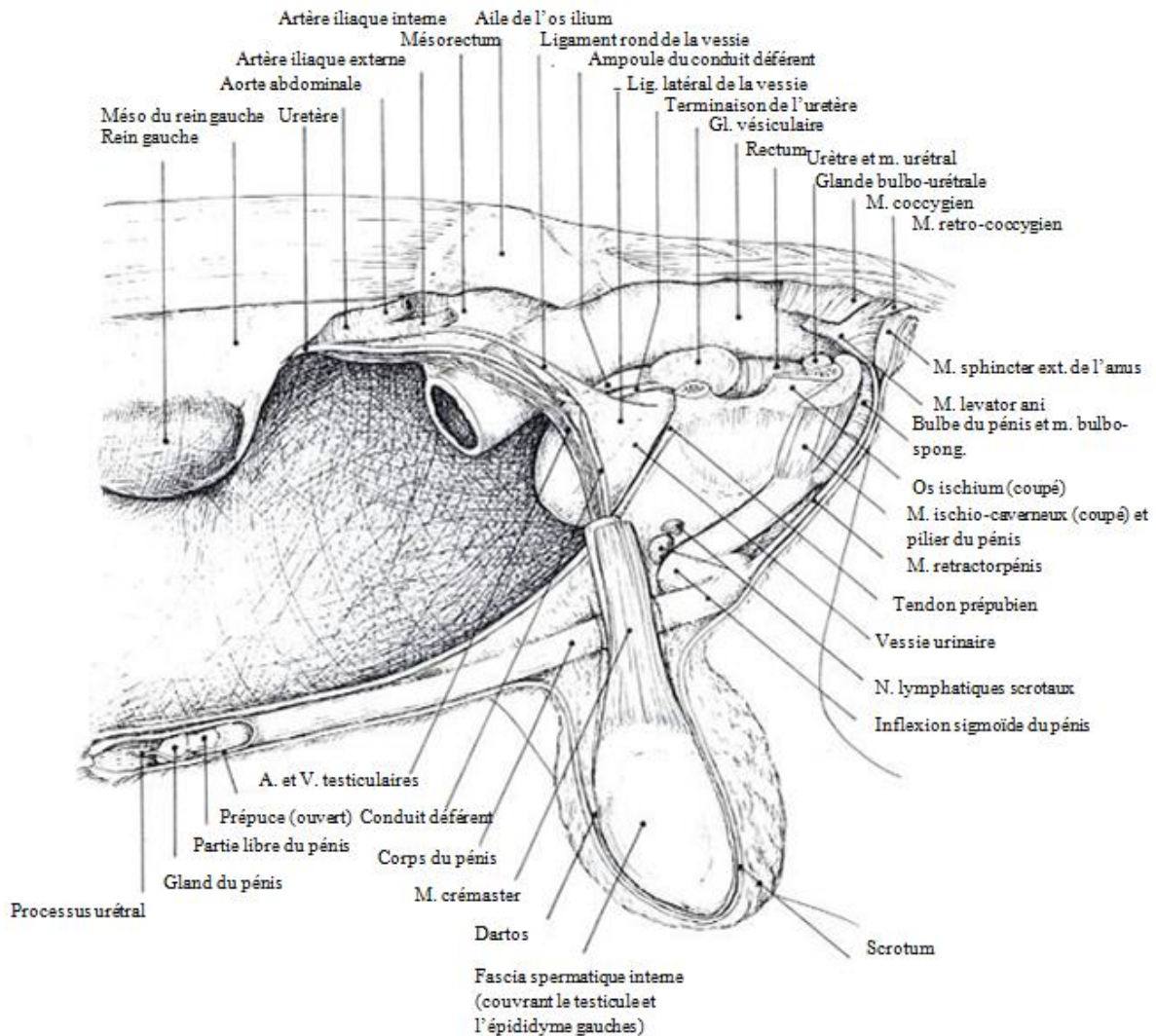
sont spécifiques et seraient présents chez tous les animaux présentant des signes cliniques. Ces tests sont prometteurs et leur développement permettra indéniablement un meilleur contrôle de la maladie dans les prochaines années.

2. Anatomie de l'appareil génital du bélier (Barone, 1990)

L'appareil génital mâle est constitué de l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme jusqu'à son dépôt dans les voies génitales de la femelle. Plusieurs parties le composent (Figure 3) :

- La section glandulaire, représentée par les testicules
- La section tubulaire, qui correspond aux voies spermatiques constituées des épидидymes et des conduits déférents
- La section uro-génitale, comprenant l'urètre auquel sont annexées les glandes génitales (la prostate, les glandes bulbo-urétrales et les glandes vésiculaires) et les organes copulateurs, le pénis et le prépuce

Figure 3 : Représentation schématique de l'anatomie de l'appareil uro-génital d'un bœlier (Vue latérale gauche, d'après Barone, 1990)



Vue latérale gauche.

2.1 Le pénis

Le pénis est l'organe copulateur mâle, formé en majeure partie de tissu érectile : les corps spongieux et les corps caverneux. Chez les Artiodactyles, le pénis présente une inflexion sigmoïde et forme le « S » pénien, qui s'efface lors d'une érection. La partie mobile, qui est introduite dans les voies génitales femelles, est protégée au repos par une enveloppe cutanée, le prépuce qui est relié au corps du pénis.

Le pénis est formé du corps et de deux extrémités, l'une fixe, la racine, et l'autre libre, le gland. Sur la face ventrale du gland s'ouvre l'ostium externe de l'urètre. Chez les ruminants, cet ostium est prolongé à l'extérieur du gland par le processus urétral. Chez le bélier, il mesure environ 4 cm.

Le corps caverneux du pénis est constitué d'une tunique albuginée enveloppant le tissu érectile. Celle-ci émet des trabécules, qui délimitent des cavernes se remplissant de sang lors de l'érection. Comme les ruminants ont un pénis de type fibro-élastique, les trabécules prédominent sur les cavernes. Le pénis a donc une consistance ferme, même au repos. Ainsi, il y a peu de dilatation du pénis lors de l'érection mais essentiellement une augmentation de longueur par effacement du « S » pénien, qui est permise par le relâchement du muscle rétracteur du pénis sous l'effet du tonus parasympathique. La reprise du tonus sympathique permet, après l'érection, le rétablissement de l'inflexion sigmoïde.

2.2 Les testicules

Ce sont les glandes génitales du mâle, qui assurent la spermatogenèse et qui ont une fonction endocrinienne (sécrétion de testostérone).

Chez les Ruminants, les testicules ont une forme ovoïde allongée. Les testicules du bélier ont une forme plus sphéroïde que ceux du taureau. Ils représentent environ 1/1000^{ème} de son poids. Ils sont verticaux, fermes et mobiles dans le scrotum. Leur consistance, en général, est ferme et élastique. Chez le bélier, qui est une espèce saisonnière, la taille des testicules varie selon la saison, elle est d'environ 300 g en saison sexuelle (en jours courts), contre 200 g en contre saison (jours longs).

Les testicules possèdent deux faces : une latérale et une médiale, deux bords : un libre et un épидидymaire et deux extrémités : une capitée et une caudée. Les deux faces sont lisses et arrondies. Le bord libre est lisse et convexe alors que le bord épидидymaire est moins convexe, plus court et longé médialement par l'épididyme. La tête de l'épididyme se trouve en continuité avec l'extrémité capitée du testicule et la queue de l'épididyme contourne l'extrémité caudée.

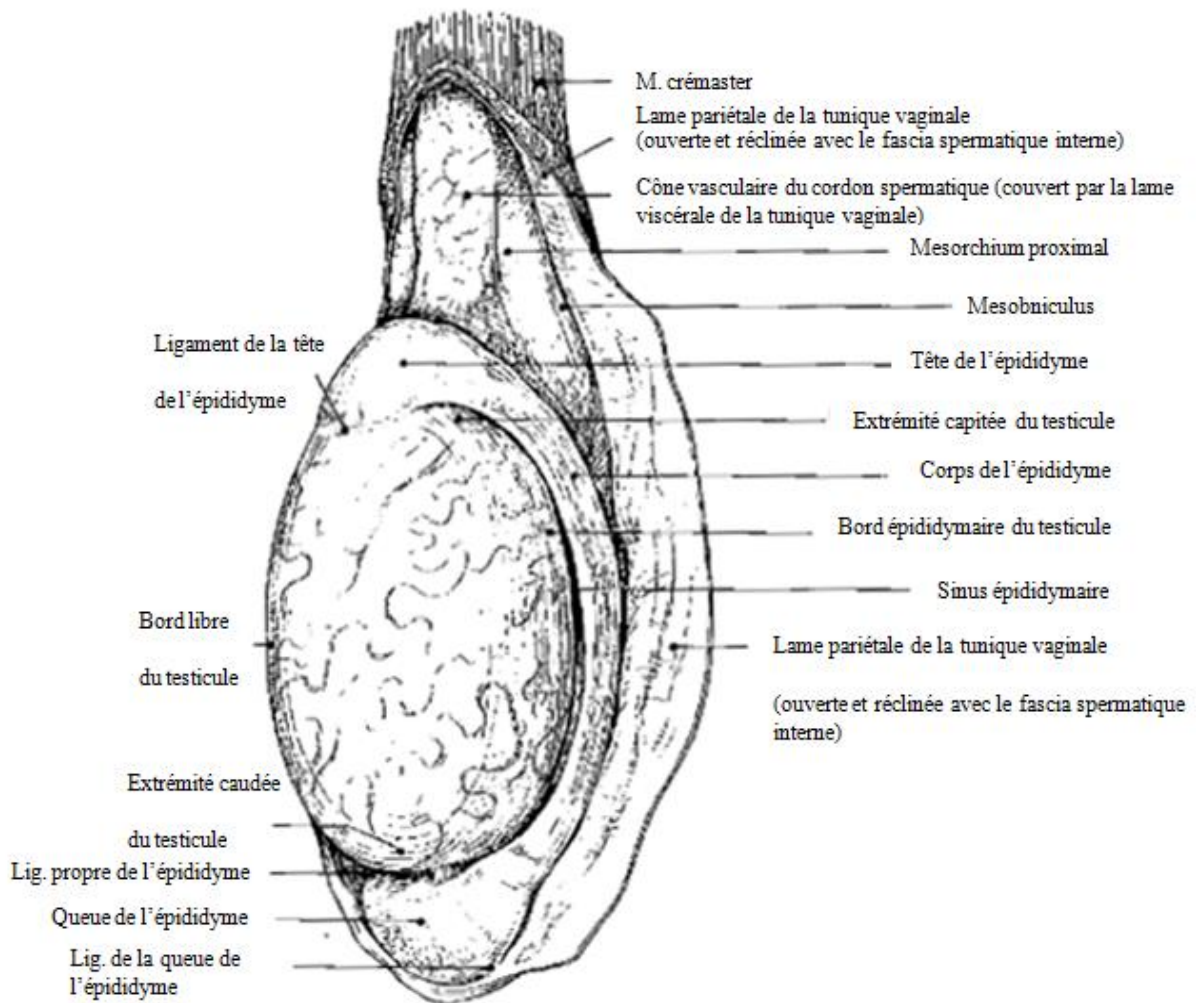
Les enveloppes entourant les testicules remplissent les rôles de protection et de soutien de ces glandes, des vaisseaux et des premières voies d'excrétion du sperme. Ces enveloppes sont des dépendances de la paroi abdominale. De l'intérieur vers l'extérieur se trouvent d'abord les enveloppes profondes : la tunique vaginale, le fascia spermatique interne et le muscle crémaster. Puis viennent les enveloppes superficielles : le fascia spermatique externe, la tunique dartos et enfin la peau scrotale qui forme un sac commun aux deux testicules. Chez les Ruminants, le scrotum est pendante, jusqu'au tarse chez le bélier, et pédonculé.

2.3 Les épидidymes

Ce sont des organes allongés, qui sont appliqués et solidarisés à la partie latérale des testicules. L'épididyme participe au transit et à la maturation des spermatozoïdes. C'est à ce niveau du transit que les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant.

L'épididyme présente une tête, un corps et une queue (Figure 4). La tête se trouve sur l'extrémité capitée du testicule dont elle reçoit les conduits efférents et il y a entre les deux structures une continuité de substance. Chez le bélier, la tête, large et plate, couvre le tiers dorsal du bord libre du testicule. Le corps, lui, est libre et simplement appliqué au testicule, sur sa face médiale. Quant à la queue, elle n'est pas en continuité de substance avec le testicule mais y est solidement attachée par le ligament propre du testicule. La queue de l'épididyme correspond au lieu de stockage des spermatozoïdes entre les éjaculations. Elle se poursuit par le conduit déférent qui longe le bord médial du testicule, remonte dorsalement au niveau du cordon et s'abouche à l'urètre pelvien.

Figure 4 : Représentation schématique d'une vue caudale du testicule et de l'épididyme gauche d'un taureau (d'après Barone, 1990)



2.4 La vascularisation des testicules et des épидидymes

Le testicule reçoit le sang de l'artère testiculaire provenant de l'aorte abdominale. Cette artère décrit des flexuosités de plus en plus amples, puis elle pénètre dans la tunique albuginée au niveau de l'extrémité capitée du testicule. Elle fait le tour du testicule d'abord par le bord épидидymaire, puis par le bord libre en contournant l'extrémité caudée. Elle se termine en plusieurs branches en regard de l'extrémité capitée.

La veine testiculaire se forme près de l'anneau inguinal profond. Les veines centrales cheminent entre les cloisons interlobulaires et gagnent le *médiastinum testis*. Les veines superficielles sont dans la tunique albuginée. A la sortie du testicule, les veines s'engagent

dans un cône vasculaire du cordon spermatique. Elles s'organisent en un réseau complexe appelé plexus pampiniforme dont les mailles enserrant les circonvolutions de l'artère testiculaire. Ce plexus sert à refroidir le sang artériel avant son arrivée au testicule afin que la spermatogenèse puisse se faire correctement. Chez le bélier, les anastomoses artérioveineuses sont nombreuses.

L'épididyme est irrigué par un rameau épидидymaire de l'artère testiculaire et la queue de l'épididyme est irriguée par des artères provenant de l'artère déferentielle. Les veines ne sont pas toutes satellites des artères.

3. La production de sperme

3.1 La spermatogenèse

La spermatogenèse est l'élaboration des spermatozoïdes. Elle est assurée en permanence par les testicules. Les gamètes sont ensuite stockés dans les voies spermatiques, et les glandes annexes contribuent à la production du liquide séminal.

C'est un processus lent, cyclique et continu, qui conduit à la production de nombreux spermatozoïdes à partir de cellules souches appelées spermatogonies. Les spermatogonies, alignées à la base des tubes séminifères, produisent des spermatocytes primaires tout en maintenant le nombre de cellules souches, grâce à des divisions par mitose. Les spermatocytes primaires produisent des spermatides haploïdes, par méiose, qui se différencient enfin en spermatozoïdes. La libération des spermatozoïdes se fait dans la lumière des tubes séminifères.

Durant la spermatogenèse, un cycle représente toutes les étapes de ce qui se produit entre deux vagues successives de libération de spermatozoïdes d'une région de l'épithélium séminifère. Chaque cycle dure environ 10 jours chez le bélier, et la spermatogenèse complète dure en moyenne 47 jours.

Mais ces durées sont variables en fonction d'un certain nombre de facteurs, notamment hormonaux. Le bélier, qui est une espèce saisonnière, présente des variations de la taille des testicules. Durant l'œstrus saisonnier, en jours longs, un plus grand nombre de spermatogonies dégénèrent, il y a par conséquent moins de spermatozoïdes produits. D'autres facteurs ont un effet négatif sur la spermatogenèse, comme les toxiques chimiques, un déficit en vitamine A, certains médicaments, des radiations et même une sous-alimentation. De plus, la spermatogenèse se déroule correctement à une température inférieure de quelques degrés à celle du corps. Quand la température n'est pas optimale, la spermatogenèse peut être altérée, c'est le cas lors de températures extérieures très faibles ou au contraire très élevées.

Le nombre de spermatozoïdes contenus dans un éjaculat dépend de la spermatogenèse (nombre de spermatozoïdes produits par les testicules) et de la fréquence des éjaculations. Au

début de la saison de monte, il faut un certain nombre d'éjaculations pour stabiliser les réserves épидидymaires en spermatozoïdes suite à l'inactivité sexuelle. A partir de ce moment uniquement, il est possible d'estimer la production journalière de spermatozoïdes à partir de l'éjaculat. Pour un bélier, cette production est en moyenne de 5 500 000 spermatozoïdes par jour.

Tableau 1 : Principales caractéristiques de la production spermatique, chez les principales espèces domestiques (d'après Hanzen, 2014)

Caractéristiques	Bélier
Poids de l'animal (kg)	100
Poids des testicules (g)	500
Production / jour en spermatozoïdes (× 1000) des deux testicules	9800
Production / jour en spermatozoïdes (× 1000) par g de tissu testiculaire	19
Récolte journalière potentielle en spermatozoïdes (× 1000)	5500
Durée du transit épидидymaire (jours)	13 à 17
Total des réserves extra gonadiques (× 1.000.000.000)	> 165
Tête de l'épididyme	23
Corps de l'épididyme	11
Queue de l'épididyme	126
Canal déférent	/

3.2 Composition du sperme

Le sperme est constitué d'un liquide complexe, le liquide séminal, qui contient un très grand nombre de spermatozoïdes dont il assure la survie. De nombreux paramètres modifient la composition de la semence comme la méthode de récolte et la sécrétion de testostérone. Il

existe également des variations inter-individuelles au sein d'une même espèce et des variations entre différents échantillons pour un même individu.

Tableau 2 : Description de la composition de la semence chez le bélier (d'après Cupps, 1991)

Sperme	Volume (mL)	0,5 – 2
	Concentration en spermatozoïdes (x 10 ⁶ /mL)	2000 – 5000
	Spermatocrite (%)	33
	pH	5,9 – 7,3
Plasma séminal	Fructose (mg / 100 mL)	150 - 600
	Sorbitol (mg / 100 mL)	26 - 120
	Acide citrique (mg / 100 mL)	137
	Acide ascorbique (mg / 100 mL)	5
	Inositol (mg / 100 mL)	10 – 15
	Acide glutamique (mg / 100 mL)	76
	Glycérylphosphocholine (mg / 100 mL)	1600 – 2000
	Sodium (mmol / L)	78
	Potassium (mmol / L)	23
	Calcium (mmol / L)	1,9
	Magnésium (mmol / L)	2,4
	Chlorures (mmol / L)	18
	Bicarbonates (mmol / L)	7,1

3.2.1 Le plasma séminal

Le plasma séminal est la partie liquide récupérée après avoir retiré les spermatozoïdes de la semence. Il est produit par le *rete testis*, les glandes accessoires de l'appareil génital mâle, les épидidymes et les testicules. C'est la glande vésiculaire qui produit la plus grande quantité du

plasma séminal chez le bélier. Ce liquide apporte de l'énergie et permet aux spermatozoïdes de se déplacer (Knobil, Neill, 1988). Comme indiqué dans le tableau 2, il contient des composés organiques (protéines, peptides, acide citrique), des ions (calcium, magnésium, chlorures, bicarbonates, sodium, potassium) et des composés énergétiques (fructose, sorbitol, glycérophosphocholine, inositol).

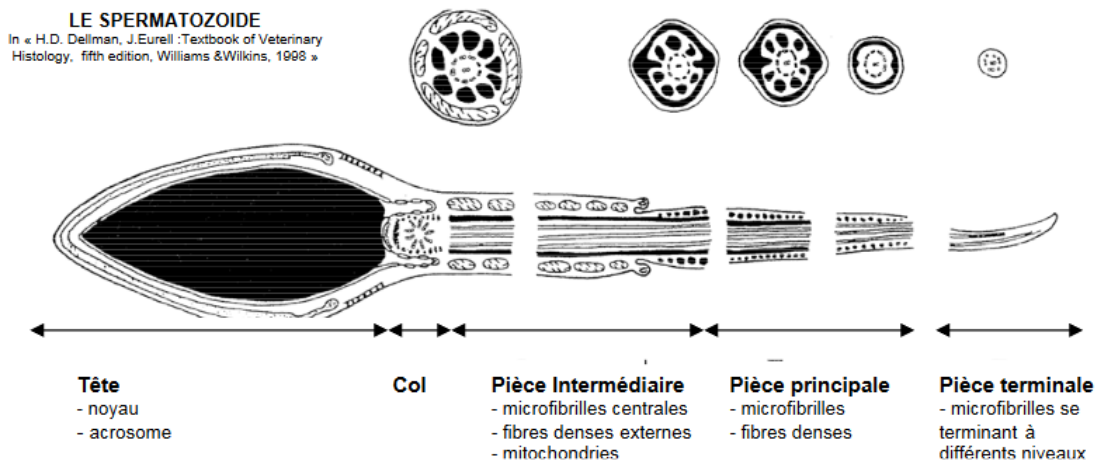
Le plasma séminal des ruminants contient, en plus de ces substances, des composés réducteurs (acide ascorbique) et des composés azotés.

3.2.2 Les spermatozoïdes

Les spermatozoïdes du bélier mesurent 75 à 80 μm . Un spermatozoïde se compose d'une tête, d'une pièce d'intermédiaire et d'un flagelle (Figure 5). Son ADN, fortement condensé, se trouve dans le noyau contenu dans la tête du spermatozoïde. La tête, qui est aplatie et mesure en moyenne 9 μm de long par 5 μm de large chez le bélier, est recouverte de l'acrosome qui contient les enzymes nécessaires à la pénétration de l'ovocyte. La pièce intermédiaire vient s'attacher sur la face caudale de la tête, elle mesure environ 14 μm et contient des mitochondries. La queue du spermatozoïde mesure 40 à 45 μm chez le bélier et est nécessaire aux déplacements.

L'obtention d'un spermatozoïde mature nécessite une étape de maturation qui a lieu dans l'épididyme et durant laquelle il perd notamment la gouttelette cytoplasmique qu'il possède à sa libération des tubes séminifères. Cette maturation conduit à l'acquisition de la motilité du spermatozoïde et de son pouvoir fécondant.

Figure 5 : Schéma d'un spermatozoïde (d'après Dellman, 1998)



4. Evaluation de la fonction sexuelle du bélier

4.1 Examen clinique de l'appareil génital externe

4.1.1 Inspection et palpation de l'appareil génital externe

L'examen débute par un examen clinique général, car les troubles de la fertilité peuvent être dus notamment à des anomalies de l'appareil locomoteur. Le scrotum est observé et palpé afin de détecter des anomalies (blessures, chaleur, douleur, abcès, hyperkératose, présence des testicules et des épидидymes). Le scrotum présente un col, qui est une zone de rétrécissement au dessus des testicules. La peau scrotale est normalement fine et non adhérente aux testicules. Pour les testicules, lorsque tout est normal, ils sont fermes et leur palpation ne doit pas entraîner de douleur. Leur mobilité peut être altérée, notamment lors de la formation d'adhérences ou de brides suite à un processus inflammatoire. A la palpation des testicules et des épидидymes, on recherchera d'éventuelles zones indurées. La consistance et le volume des deux testicules sont comparés. La consistance testiculaire peut être augmentée ou diminuée lors de dégénérescence des testicules. La taille des testicules étant fortement corrélée à la production de spermatozoïdes (Ott et al., 1980), des anomalies au niveau des testicules (modification de taille, dissymétrie) peuvent conduire à des anomalies de la fertilité. L'aspect général du fourreau et du prépuce est observé, puis le pénis est extériorisé afin de chercher la présence de lésions (balanoposthite, blessures, tumeurs...).

4.1.2 Mesure de la circonférence scrotale

La plus grande circonférence des testicules est mesurée à l'aide d'un mètre ruban sur un animal debout et après les avoir descendus au fond du scrotum (Photographie 1).

Photographie 1 : Mesure de la circonférence scrotale sur un bélier



Cette circonférence est corrélée à la taille des testicules et à leur poids. Par conséquent, la circonférence scrotale renseigne indirectement sur la production de spermatozoïdes (Philizot, 2005 et Coulter et Foote, 1979), et donc sur le potentiel reproducteur du bélier (Tableau 3).

Pour une mesure effectuée pendant la saison de reproduction, quand la taille des testicules est maximale, la circonférence scrotale doit être d'au moins 33 cm pour des béliers de plus d'un an. Les béliers n'ayant pas encore un an doivent avoir une circonférence scrotale supérieure à 30 cm pour qu'elle soit satisfaisante. Lorsque qu'elle est jugée insuffisante, il faut rechercher d'éventuelles lésions d'hypoplasie ou de dégénérescence testiculaire ou une ectopie testiculaire (Ott, 1987).

Tableau 3 : Détermination du potentiel reproducteur du bélier en fonction de sa circonférence scrotale donnée en centimètres (d'après Van Metre, 2012)

	Très bon	Bon	Moyen	Insuffisant
Béliers ≤ 14 mois	≥ 36	30 – 35	27 – 29	< 26
Béliers > 14 mois	≥ 40	33 - 39	30 - 32	< 29

La circonférence scrotale renseigne sur le potentiel de reproduction du bélier, mais elle dépend de plusieurs facteurs dont il est nécessaire de tenir compte pour l'interprétation des valeurs :

- De la race (Söderquist et al., 2006)
- De l'âge
- De la saison : durant l'œstrus hivernal, la circonférence scrotale peut perdre 2 voire 3 cm (Kimberling et al., 1997)
- Du poids vif et de l'état d'engraissement : la taille des testicules peut être surestimée sur des béliers obèses
- De pathologies scrotale, testiculaire ou épидидymaire

4.1.3 Examen échographique de l'appareil génital mâle

L'examen échographique de l'appareil génital externe permet de mettre en évidence des lésions intra ou extra-testiculaires mises en évidence ou non lors de la palpation (Kastelic et al., 2012).

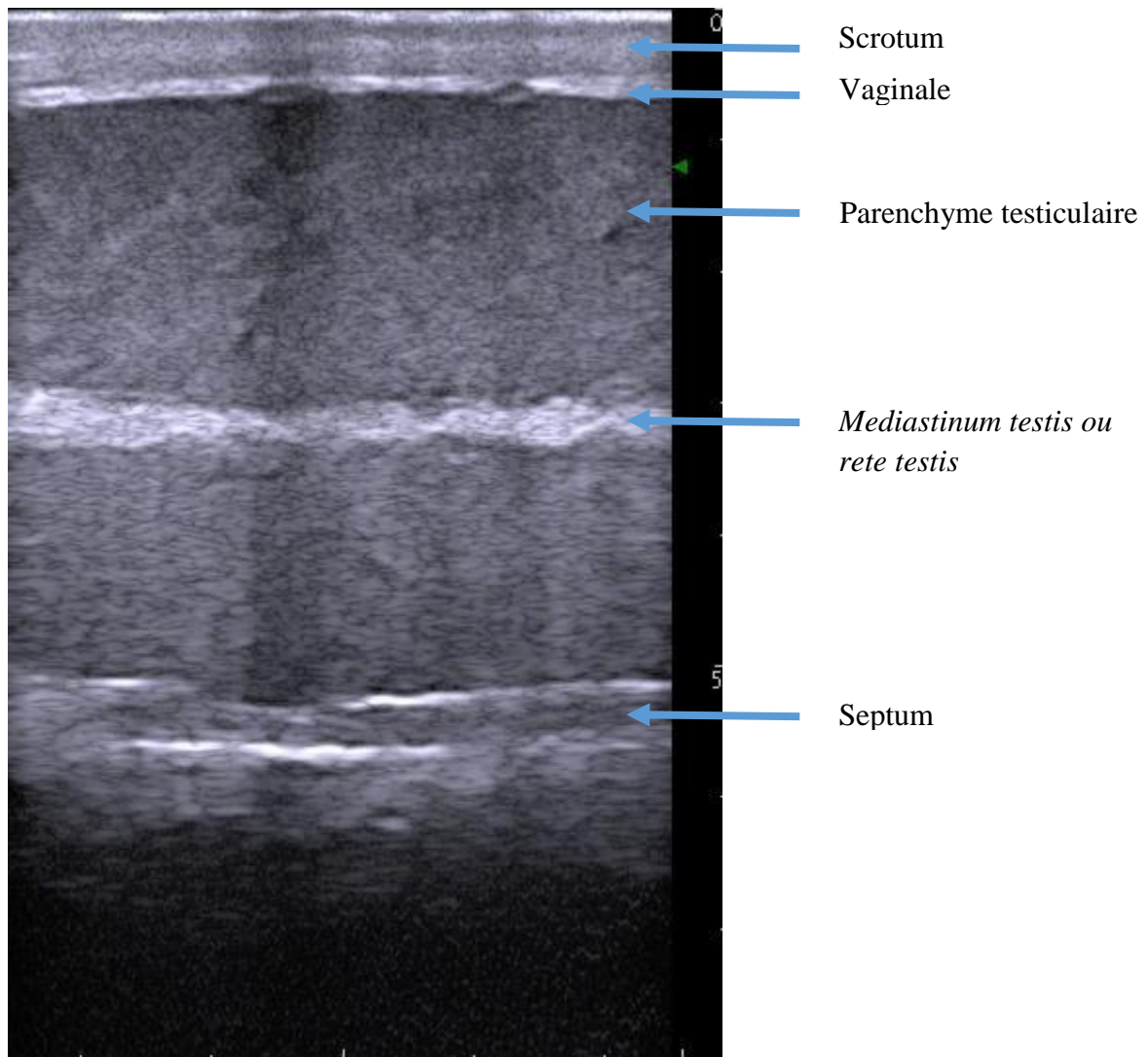
Sur une coupe, plusieurs structures peuvent être observées :

- La peau du scrotum : structure hyperéchogène et épaisse entourant la structure testiculaire
- Les enveloppes testiculaires sont hyperéchogènes mais, elles présentent une ligne anéchogène vasculaire entre les couches pariétales et viscérales de la tunique vaginale.

La tunique vaginale n'est identifiable que lorsqu'il y a une accumulation excessive de liquide (lors d'une hydrocèle notamment)

- Le parenchyme testiculaire présente une échogénicité homogène même si parfois chez les animaux âgés il est possible d'observer de petits foyers hyperéchogènes dans le parenchyme, correspondant à des points de calcification. Le parenchyme testiculaire est moyennement échogène
- Le *rete testis* est la structure la plus échogène du parenchyme. Chez des béliers âgés de plus de 13 mois, le *rete testis* paraît plus échogène comparativement à celui des individus plus jeunes (Gouletsou et al., 2003)
- Le plexus pampiniforme : structure tubulaire circonvoluée anéchogène au-dessus du pôle dorsal du testicule (Ginther, 1998)

Image échographique 1 : Coupe longitudinale d'un testicule



Afin d'observer la tête et la queue de l'épididyme, il faut réaliser une coupe au niveau des pôles proximaux et distaux du testicule. En effet, la tête de l'épididyme se situe au niveau du pôle crânio-proximal du testicule et la queue est sous le bord ventral du testicule. Il est souvent difficile d'échographier la queue de l'épididyme en raison des plis de la région ventrale du scrotum, qui ne permettent pas toujours d'appliquer correctement la sonde sur cette zone. L'épididyme est moins écho-gène que le testicule.

4.2 Protocole de récolte de sperme et de l'évaluation de sa qualité

4.2.1 La récolte de sperme

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour la récolte de sperme de bélier :

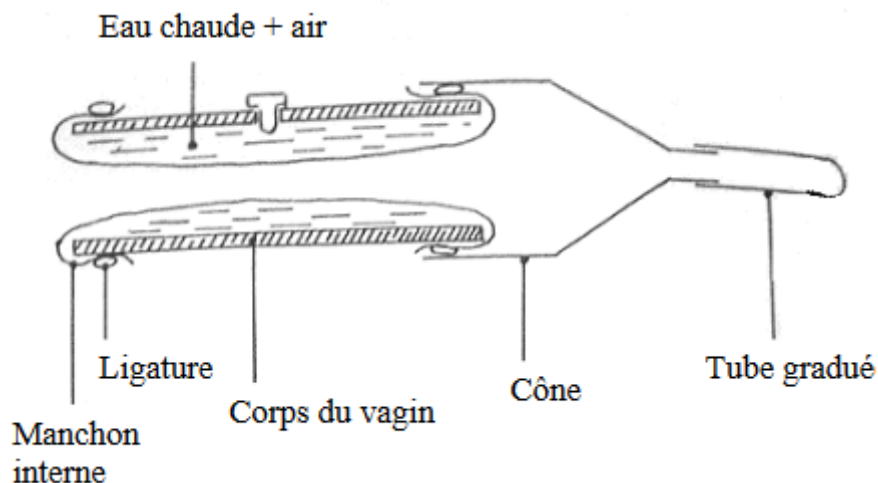
- La récolte au vagin artificiel. C'est la méthode utilisée au centre d'insémination. Cette méthode n'est pas utilisable pour les béliers de monte naturelle, en élevage. En effet, il faut que l'animal soit habitué à l'homme et en élevage, elle nécessite la présence d'une femelle en chaleurs.
- La récolte de sperme par électroéjaculation. Des électrodes placées dans le rectum du bélier envoient des stimuli électriques qui stimulent les centres nerveux de l'érection et de l'éjaculation.

La méthode de collecte de sperme à l'électroéjaculation ne permet pas toujours d'obtenir une érection. Les impulsions électriques stimulent les centres nerveux de l'érection et de l'éjaculation (celui de l'érection est situé entre L1 et S3 et celui de l'éjaculation est situé au niveau de L2 et L3) (Stievenart, 1997). Toutefois, les stimulations électriques envoyées par la sonde linéaire peuvent atteindre d'autres centres nerveux. C'est pourquoi, il est fréquent d'observer des contractions musculaires (extension des membres postérieurs et dos voussé). Ces effets non souhaités dépendent de l'individu, de la position de la sonde dans le rectum et de l'électroéjaculateur. Ces réactions sont plus fréquentes lorsque le temps séparant deux impulsions est faible (Stievenart, 1997). Le bélier peut ressentir un certain inconfort, c'est pourquoi, il faut contrôler la montée en voltage et stopper les stimulations si le bélier manifeste des signes de douleurs, ce qui est très rare.

Par ailleurs, cette méthode entraîne une stimulation des glandes accessoires (Rigal, 2008), ce qui conduit à une dilution de l'éjaculat (Barth, 2007). Pour certains béliers, ces stimulations électriques ne conduiront pas à l'éjaculation. Mais, il ne s'agit que de cas rares et pour la majorité des individus l'électroéjaculation conduit à l'obtention d'une semence de qualité.

La méthode de collecte de sperme au vagin artificiel reproduit davantage les stimuli physiologiques. Le vagin artificiel comporte deux parties, un cylindre extérieur en caoutchouc dur et épais et une capote intérieure en latex (Figure 6). Ces deux parties glissées l'une dans l'autre forment ainsi une cavité qui est remplie d'eau à 41-44°C et dont la pression rappelle le vagin de la femelle. L'extrémité par laquelle est introduit le pénis est lubrifiée. A l'autre extrémité se trouve un cône en caoutchouc sur lequel est placé un tube plastique afin de récolter le sperme.

Figure 6 : Schéma d'un vagin artificiel (d'après Barret, 1992)



Il faut que le vagin artificiel soit adapté à la conformation des béliers afin de ne pas les blesser. Une surpression de l'eau dans la cavité est à éviter car elle entraîne un risque d'éclatement de la paroi interne et le pénis risque de ne pas avoir assez de place lors de l'éjaculation.

La récolte doit se faire dans un endroit calme pour éviter toute situation stressante et sur un sol non glissant pour assurer un saut optimal. L'utilisation d'un animal bouter en train se révèle bénéfique mais non indispensable.

Le prélèvement de sperme doit se faire dans de bonnes conditions hygiéniques, ainsi la capote est désinfectée entre chaque saut.

Avant la collecte de sperme, le bélier est stimulé par deux à trois fausses montes, puis au moment du saut, le pénis est dévié et introduit dans le vagin artificiel. L'éjaculation est rapide et s'accompagne du coup de rein du bélier.

Cette méthode permet chez le bélier de récolter trois à huit éjaculats par jour.

4.2.2 Examen séminologique

L'évaluation de la qualité du sperme vise à évaluer sa fertilité.

Plusieurs paramètres macroscopiques sont évalués : le volume, la couleur, la consistance. L'examen microscopique permet d'évaluer la motilité massale, la motilité individuelle et la concentration spermatique. La semence doit être conservée à 37°C pour l'examen de la motilité (Kimberling et al., 1997).

La réalisation d'un frottis coloré permet d'évaluer au grossissement $\times 1000$ la viabilité des spermatozoïdes et d'éventuelles anomalies.

Les anomalies de la morphologie des spermatozoïdes peuvent être classées en deux catégories. D'abord, les anomalies primaires survenant au cours de la spermatogenèse et les anomalies secondaires qui ont lieu pendant la phase de maturation dans l'épididyme (Boundy, 1998 et Kimberling et al., 1997). Certaines lésions peuvent être à la fois primaires et secondaires. Les anomalies des spermatozoïdes peuvent aussi être classées en fonction de leur effet négatif sur la fertilité en anomalies majeures ou mineures.

Les anomalies primaires concernent surtout les problèmes au niveau de la tête des spermatozoïdes (tête seule, anomalies de forme, têtes détachées) ainsi que la persistance de la gouttelette cytoplasmique proximale au niveau de la pièce intermédiaire.

Il est classique d'avoir un faible pourcentage de tête sans queue, mais au-delà de 5%, le bélier peut être atteint d'hypoplasie, de dégénérescence testiculaire ou d'une inflammation des glandes annexes. Cette anomalie est responsable d'infertilité (Hanzen, 2014).

Les anomalies secondaires concernent l'enroulement ou le repliement du flagelle ou la persistance de la gouttelette cytoplasmique distale (Parkinson, 2009).

Les lésions de la queue, fréquemment décrites, résultent le plus souvent de la préparation du frottis et principalement de l'exposition prolongée du sperme à des solutions hypotoniques. Elles n'auraient donc pas systématiquement une signification pathologique.

PARTIE EXPERIMENTALE

Notre étude avait pour objectif d'évaluer si l'infection par le *Jaagsiekte Sheep Retrovirus* peut entraîner une altération de la fonction sexuelle des béliers. La fonction sexuelle a été évaluée par un examen de l'appareil génital et de la qualité de la semence. L'infection par JSRV a été mise en évidence par amplification du génome viral par PCR.

1. Matériels et méthodes

1.1 Présentation des élevages

Cette étude a été réalisée sur 79 béliers issus du CIA du Lot et de deux élevages sélectionneurs ovins de race Causse du Lot. Ces élevages ont été sélectionnés sur la base du volontariat par le CIA du Lot, en raison de la présence endémique de l'adénocarcinome pulmonaire :

- Le GAEC CANCE Bas, situé à LE BASTIT (46 500). Depuis 2012, cet élevage a présenté des cas cliniques d'adénocarcinomes pulmonaires, induits par JSRV, confirmés par examens macroscopiques et anatomopathologiques avec mise en évidence du génome de JSRV (C. Leroux, Equipe PR2T, Lyon).
- Le GAEC des Sols, situé à Fontanes du Causses (46 240). Depuis deux ans, des signes cliniques sévères évocateurs d'adénocarcinome pulmonaire ont été observés sur des brebis avec une mortalité relativement élevée.
- Le centre d'insémination artificielle de Lunegarde (46 240). Sur la période 2013-2014, la présence du *Jaagsiekte Sheep Retrovirus* a été mise en évidence par PCR. Sur les 103 béliers testés, 22 avaient du génome viral détectable dans la semence.

1.2 Description des animaux

Critères d'inclusion

Tous les béliers pubères (n=79) de race Causse du Lot (Photographie 2) provenant de ces trois élevages du Lot ont été inclus dans l'étude.

Photographie 2 : Béliers Causses du Lot participant à l'étude



Critère d'exclusion

Trois béliers, atteints d'affections génitales, ont été collectés pour un examen séminologique :

- Un bélier atteint de balanoposthite, a eu une éjaculation incomplète avec la présence de sang dans le sperme.
- Un bélier atteint d'épididymite.
- Un bélier âgé de 5 ans et atteint d'une dégénérescence testiculaire gauche.

Ces trois béliers ont été exclus de l'étude sur la fonction sexuelle a posteriori.

La répartition des béliers entre les différents élevages était la suivante : 20 béliers issus du GAEC CANCE Bas, 20 béliers issus du GAEC des Sols et 36 béliers issus du CIA de Lunegarde.

L'étendue des âges varie de 0,98 à 4,5 années, avec 65,4% de la population entre 1 et 1,5 an (Tableau 4).

Tableau 4 : Répartition des béliers de l'étude en fonction de leur classe d'âge

Classe d'âge (en années)	Nombre de béliers	Fréquence (%)
< 1,5	51	67,1
[1,5 - 2,5]	13	17,1
>2,5	12	15,8
Total	76	100

L'âge moyen (\pm écart-type et étendue) des béliers est de $2,05 \pm 0,78$ ans (0,98-3,14 ans) au GAEC CANCE Bas, $2,0 \pm 0,97$ ans (1,1-4,1 ans) au GAEC des Sols et $1,19 \pm 0,023$ ans (1,15-1,24) au CIA Lunegarde. Les béliers du CIA de Lunegarde, dont la semence est collectée dès l'âge de 7 mois, sont plus jeunes que ceux des élevages.

1.3 Examen général

Pour chaque bélier, les antécédents pathologiques du troupeau et du bélier, ainsi que la préparation à la lutte, ont été décrits. L'aspect général des béliers a été apprécié.

Leur état d'engraissement a été évalué au travers d'une note d'état corporel (NEC). Cette note allant de 0 pour un animal rachitique à 5 pour un animal obèse, est déterminée grâce à la grille établie par Scott (2001) prenant en compte les critères suivants (Tableau 5) :

- La proéminence des apophyses épineuses des vertèbres lombaires
- La proéminence, ainsi que le degré de couverture graisseuse des apophyses transverses des vertèbres
- L'étendue des tissus musculaires sous-lombaires
- Le développement du muscle (la noix) et sa forme

Tableau 5 : Grille de classification de la note d'état corporel chez les ovins (d'après Scott, 2001)

Note	Caractéristiques
0	Animal cachectique, sans réserve grasseuse ou tissu musculaire palpable.
1	Apophyses épineuses et transverses saillantes et pointues. Les doigts passent facilement sous les apophyses transverses. Noix mince et concave, sans graisse.
2	Apophyses épineuses proéminentes et arrondies mais détectées par palpation. Apophyses transverses arrondies. Par simple pression, les doigts passent sous les apophyses transverses. Noix moyennement développée, petite couverture grasseuse.
3	Apophyses épineuses peu proéminentes, arrondies, lisses, détectées par une pression. Apophyses transverses arrondies. Une pression assez ferme permet la détection des apophyses transverses. Noix légèrement convexe, couverture grasseuse moyenne.
4	Apophyses épineuses détectées par pression. Extrémités des apophyses transverses non détectables. Les doigts ne peuvent pas s'engager sous les apophyses transverses. Noix convexe. Couverture grasseuse épaisse.
5	Apophyses épineuses et transverses non détectables. Les doigts ne peuvent pas s'engager sous les apophyses transverses. Noix très convexe, importante couverture grasseuse.

1.4 Examen de l'appareil génital

Le scrotum a été inspecté et la circonférence scrotale a été mesurée grâce à un mètre ruban. Les testicules et les épидидymes ont été palpés. Le fourreau et le pénis (s'il est extériorisé lors de la collecte de sperme) ont également été inspectés.

Lorsqu'une anomalie des testicules ou des épидидymes était observée à la palpation, un examen échographique de l'appareil génital externe a été réalisé avec l'appareil MyLabOne (Hospimedi ®) avec une sonde linéaire (fréquence 10MHz). La sonde, après avoir été enduite de gel échographique, est placée latéralement sur le scrotum de manière à visualiser le parenchyme testiculaire, la tête et la queue des épидидymes et le *rete testis*.

1.5 Récolte de la semence

La majorité des béliers, 66 sur les 76 de l'étude, ont été prélevés à l'aide de l'électroéjaculateur (ElectroJac5, Ideal Instruments ®, Photographies 3 et 4). Avant la récolte de sperme, des mesures d'hygiène ont été prises afin d'éviter au maximum la contamination

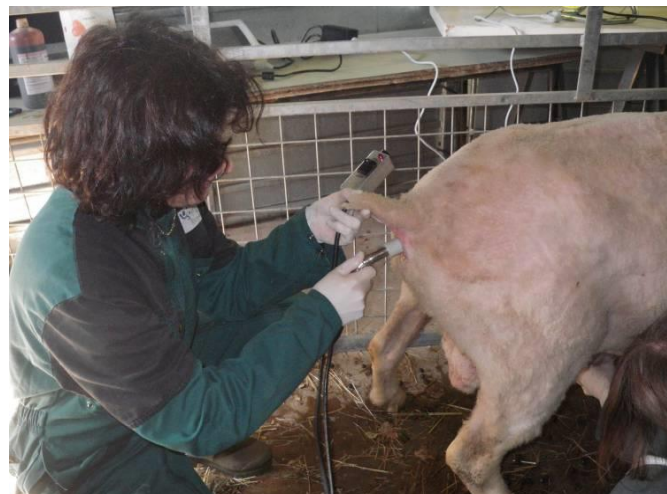
du sperme. Lorsque cela était nécessaire, les poils du fourreau ont été coupés et la région autour de l'orifice préputial a été nettoyée avec de la polyvidone iodée (Vétédine savon ®) et rincée avec de l'eau. Le rectum est vidé des fèces et si elles sont accessibles, les glandes vésiculaires sont massées. La sonde est lubrifiée et introduite dans le rectum du bélier. Pour des raisons de bien-être animal, les stimulations électriques ont été contrôlées et même stoppées dès que l'animal manifestait des signes de stress ou d'inconfort. Quand cela était possible, un opérateur a maintenu le pénis extériorisé afin de limiter les contaminations du sperme. Le sperme a été récolté dans un tube stérile de 15 mL.

Pour 4 béliers (5,1 %), l'éjaculat collecté était aqueux et le volume et/ou la concentration en spermatozoïdes étaient très faibles, indiquant, en l'absence de lésion génitale, un échec de collecte. Ces 4 béliers, tous indemnes de JSRV, ont été exclus de l'analyse séminologique.

Photographie 3 : L'électroéjaculateur ElectroJac5 utilisé pour les récoltes de semence



Photographie 4 : Collecte de sperme à l'électroéjaculateur sur un bélier



Pour 10 béliers du CIA, le sperme a été collecté au vagin artificiel. Ces béliers étaient déjà habitués à cette méthode de collecte. La semence des béliers a été collectée après une stimulation comprenant deux à trois fausses montes.

Les éjaculats ont été maintenus à 37°C jusqu'à leur examen dans les minutes qui ont suivi la collecte.

Le matériel de prélèvement utilisé, notamment les cônes, était nettoyé et désinfecté entre chaque individu.

1.6 Détermination de la présence du virus de l'adénocarcinome pulmonaire dans le sperme

Les 76 éjaculats collectés ont été maintenus à 37°C jusqu'à leur examen séminologique dans les minutes qui ont suivi la collecte. L'éjaculat frais non congelé a été envoyé au Dr Leroux (équipe PR2T à Lyon) pour la détection par PCR de la présence de JSRV. Après extraction de l'ADN total, une région 3' terminale (fin de env + LTR) d'environ 200 paires de bases du provirus JSRV a été amplifiée par PCR à l'aide d'amorces discriminant strictement les formes exogènes de JSRV des formes enJSRV. La présence d'ADN amplifiable a été au préalable confirmée par amplification dans le gène actine (Gomes et al., 2017).

1.7 Examen séminologique

Les paramètres séminologiques évalués directement après la collecte sont le volume, la couleur, la consistance, la motilité massale, la motilité individuelle et la concentration spermatique.

Le volume est déterminé directement sur le tube, à l'aide des graduations. La couleur est classée suivant les catégories suivantes : translucide, blanchâtre ou jaunâtre, contenant du sang ou de la matière organique. La consistance du sperme est : aqueuse, laiteuse ou crémeuse. La motilité massale et la motilité individuelle ont été appréciées sous un microscope à contraste de phase et à platine chauffante. La motilité massale a été évaluée au grossissement x100, sur une goutte de semence non diluée, déposée directement sur une lame. L'intensité des vagues provoquées par le déplacement des spermatozoïdes et l'épaisseur de l'anneau formé par les spermatozoïdes ont été appréciées en périphérie d'une goutte (Tableau 6).

Tableau 6 : Motilité massale en fonction des observations microscopiques

Score de motilité massale	Observations microscopiques
0	Absence de spermatozoïde mobile
1	Léger mouvement, pas de vague
2	Mouvements très lents, vagues peu nombreuses
3	Mouvements de faible amplitude, vagues nombreuses
4	Mouvements rapides, sans tourbillon
5	Mouvements rapides, avec tourbillons

La motilité individuelle correspond au pourcentage de spermatozoïdes ayant un mouvement rectiligne uniforme qui traversent le champ du microscope. Elle a été évaluée au grossissement x400, après une dilution de la semence au 20^{ième} (OptidylND). La concentration spermatique (en milliard/ mL) a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre (Accuread, IMV Technologies, L'Aigle, France).

1.8 Réalisation et lecture des frottis

Des frottis colorés du sperme ont été réalisés directement après la collecte. 50 µL de semence ont été mélangés à 50 µL d'éosine-nigrosine (Sperm VitalStain®, Nidacón, Suède). Une goutte du mélange a été déposée sur une lame dégraissée, puis étalée à l'aide d'une lame rodée. Les lames ont été lutées immédiatement avec de l'Histolaque LMR® permettant ainsi de conserver les lames et de différer leur lecture.

La viabilité des spermatozoïdes et les anomalies spermatiques ont été déterminées en comptant au moins 200 spermatozoïdes par lame au grossissement x1000 avec de l'huile à immersion. Le pourcentage de spermatozoïdes vivants a été déterminé. En effet, le colorant ne pénètre pas dans les spermatozoïdes vivants. Ainsi, les spermatozoïdes non colorés sont considérés vivants, alors que les spermatozoïdes colorés en rose sont considérés morts. La lecture de ces frottis a été réalisée par deux opérateurs différents (Docteur Patricia Ronsin et moi-même) afin d'évaluer la répétabilité inter-opérateur. Les anomalies ont été classées en plusieurs catégories en fonction de leur localisation (anomalies de tête, de pièce intermédiaire et de flagelle) et le pourcentage total d'anomalies par bélier a été calculé.

Un score séminologique a été déterminé pour chaque bélier à partir de plusieurs critères : la motilité individuelle, la quantité de spermatozoïdes par éjaculat et le pourcentage de spermatozoïdes normaux (Tableau 7).

Tableau 7 : Classification de la semence en fonction du score sémiologique (Kimberling et al., 1997, Ott et al., 1980, Van Metre et al., 2012)

Note	1	4	7
Nombre de spermatozoïdes/éjaculat (x10⁹)	≤ 1]1 -2]	>2
Motilité individuelle (%)	≤ 30]30- 70]	>70
Spermatozoïdes normaux (%)	≤ 50]50- 70]	>70
Score sémiologique	3-9	12-15	18-21
Classification	Mauvais	Moyen	Bon

1.9 Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type, médiane et étendue.

L'effet du statut vis-à-vis du JSRV et de la classe d'âge sur la mesure de la circonférence scrotale a été testé par une analyse de variance à l'aide du logiciel SYSTAT 12. Pour les paramètres séminologiques suivants, volume, motilité individuelle (transformation logarithmique), concentration de l'éjaculat en spermatozoïdes, quantité totale de spermatozoïdes par éjaculat, pourcentage de spermatozoïdes vivants et pourcentage d'anomalies spermatiques, les effets de l'âge (classe d'âge <1,5 ; [1,5-2,5] ;>2,5), du statut pathologique, et de la méthode de collecte (électroéjaculateur ou vagin artificiel) ont été évalués par une analyse de variance à 3 facteurs. Compte tenu de notre plan expérimental déséquilibré, il n'a pas été possible de prendre en compte les interactions entre les différents facteurs. Sur l'ensemble des béliers collectés à l'électroéjaculateur, les effets de l'âge (Classe d'âge) et du statut pathologique sur le score sémiologique (classe) ont été testés par un test χ^2 (Chi-deux). Sur la population de béliers jeunes, l'effet de la méthode de collecte sur le score sémiologique (classe) a été testé par un test χ^2 (Chi-deux).

Pour l'ensemble des tests statistiques, le seuil de signification a été fixé à $p = 0,05$.

2. Résultats et discussion

2.1 Présence du virus JSRV dans le sperme des béliers

Sur les 76 échantillons de sperme, l'ADN de JSRV a été détecté par PCR chez 4 béliers (Tableau 8), qui ne présentaient pas de signe clinique d'adénocarcinome. Ils étaient répartis entre le CIA du Lot et les deux élevages sélectionneurs (GAEC des Sols et GAEC Cance Bas) et sont âgés de 1,10 ; 1,21 ; 2,13 et 3,10 ans.

Parmi les 72 béliers avec un résultat PCR négatif, un bélier (numéro 40509), âgé de 2,89 ans et issu du GAEC Cance Bas, a développé un adénocarcinome pulmonaire clinique et a donc été considéré comme appartenant à la catégorie « positif ». Ces données sont cohérentes avec le fait que la maladie clinique est rencontrée le plus souvent chez des individus ayant plus de deux ans, avec une incidence maximale entre trois et quatre ans (OIE, 2008).

Tableau 8 : Nombre de béliers dont le sperme contient du JSRV ou atteint cliniquement d'adénocarcinome pulmonaire, par élevage

Élevage	Nombre de béliers positifs vis-à-vis du JSRV	Prévalence de l'infection (%)
GAEC des Sols	2/20	10
GAEC Cance Bas	2/20 (incluant le bélier avec des signes cliniques d'adénocarcinome)	10
CIA de Lunegarde	1/36	2,8
Total	5/76	6,6

Ces résultats mis à disposition par le Dr C. Leroux et obtenus dans le cadre du projet de recherche de l'équipe PR2T, mettent en évidence la présence de génome de JSRV dans la semence de béliers, suggérant une potentielle transmission par voie sexuelle (C. Leroux et al., manuscrit en cours de rédaction).

2.2 Etat d'engraissement des béliers

Quatre-vingt dix sept virgule quatre pourcents des 76 béliers de l'étude avaient une note d'état corporel correcte, comprise entre 2 et 3,8, avec une moyenne (\pm écart-type) de $3,0 \pm 0,14$, une médiane de 3 et une étendue [2,0-3,8]. Un seul bélier avait une NEC de 2 jugée insuffisante, probablement associée à une diarrhée chronique observée le jour des prélèvements. Un seul individu avait une note d'état corporel trop importante, de 3,8.

L'état corporel joue un rôle important sur le potentiel de reproduction du mâle (CIIRPO, 2016). Des béliers trop gras peuvent présenter des troubles de la fertilité (CIIRPO, 2009).

C'est pourquoi, il faut qu'à la mise à la lutte leur NEC soit optimale c'est-à-dire comprise entre 2,5 et 3,5 (Kimberling et al., 1997), ce qui passe par une bonne maîtrise de l'alimentation et, si nécessaire, un flushing deux mois avant la période de reproduction.

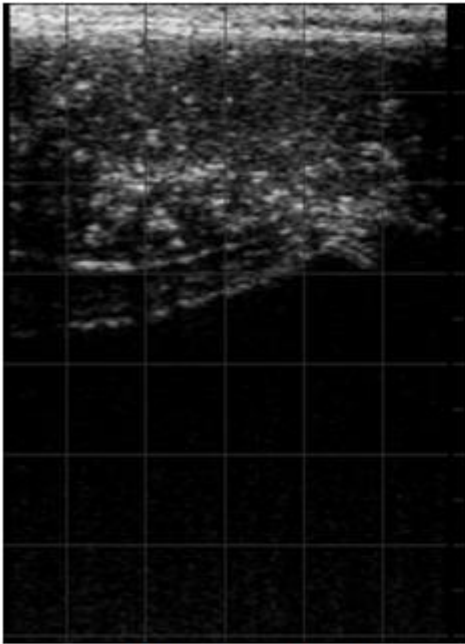
2.3 Lésions de l'appareil génital

Tableau 9 : Lésions de l'appareil génital dans la cohorte étudiée des 79 béliers, en fonction de leur statut JSRV

Localisation	Lésion	PCR négative (n=74)	PCR positive ou atteint d'adénocarcinome (n=5)
	Absence	71	5
Testicule	Dégénérescence + calcifications	1	0
Epididyme	Epididymite	1	0
Pénis	Balanoposthite	1	0
Total des lésions		3 /74	0/5

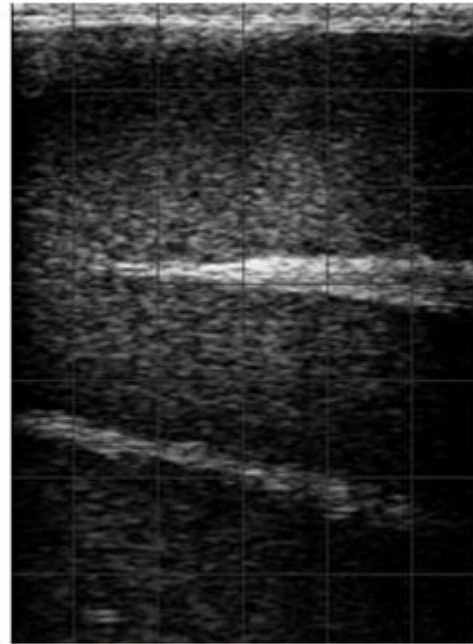
Parmi les 79 béliers, 3 avaient des lésions indépendamment de leur statut JSRV. Un bélier a présenté une épидидymite sévère, associée à une détérioration de la qualité du sperme. Un autre mâle a présenté une atrophie du testicule gauche. Le testicule gauche était plus petit que le droit et présentait un parenchyme testiculaire hétérogène avec des calcifications sévères (Image échographique 2). Sa circonférence scrotale était de 32,5 cm. Cette lésion unilatérale n'a pas eu de répercussion sur la qualité de la semence. Elle a été observée sur le bélier le plus âgé (5 ans).

Image échographique 2 : Coupes longitudinales de testicules présentant des lésions de calcification, importantes à gauche et rares sur le testicule droit



TESTICULE GAUCHE

Parenchyme testiculaire homogène, le rete testis plus échogène est visible au centre.



TESTICULE DROIT

Parenchyme testiculaire très hétérogène présentant de nombreuses zones de calcification hyperéchogènes.

La dernière lésion observée est une balanoposthite. Le sperme récolté lors de l'électroéjaculation avait un volume réduit et était contaminé par du sang, ce qui peut interférer avec la qualité du sperme. Cette lésion, bien que classée comme légère, a entraîné l'exclusion du bélier de cette étude.

Photographie 5 : Bélier atteint d'une balanoposthite, le gland et le prépuce sont rouges



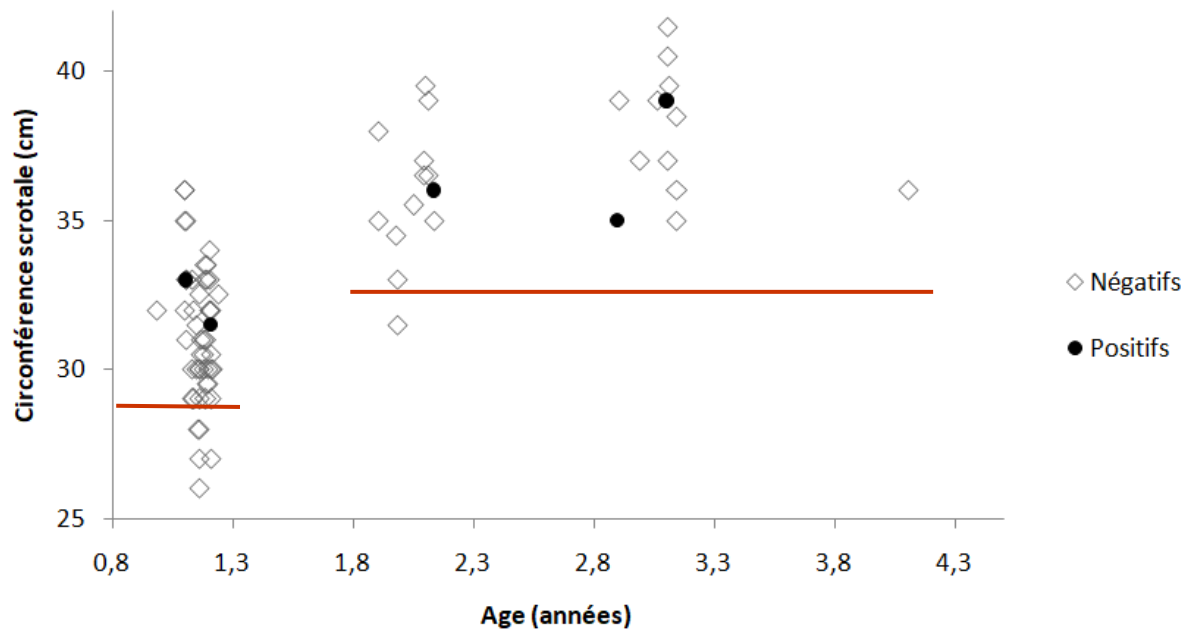
Pour les trois béliers présentant des lésions de l'appareil génital, le génome de JSRV n'a pas été retrouvé dans leur sperme et ils étaient asymptomatiques. Il semble donc que la présence de JSRV dans le sperme ne soit pas associée à des lésions de l'appareil génital.

Cependant, seules les lésions détectables à l'examen clinique ont pu être mises en évidence. En effet, il était difficile de réaliser des échographies systématiquement sur tous les animaux en raison de contraintes de temps, l'échographie n'a été réalisée que lorsqu'une anomalie était détectée à la palpation. Ainsi, il est possible que certaines lésions, non décelables à la palpation, n'aient pas été détectées (Watt, 1978). Ces trois béliers ont été exclus de l'étude sur la fonction sexuelle.

2.4 Circonférence scrotale

Le graphique 1 présente les valeurs de circonférence scrotale des 76 béliers en fonction de l'âge. La moyenne (\pm écart-type) des circonférences scrotales de l'ensemble des béliers ($n=76$) de l'étude est de $33,0 \pm 3,51$ cm et la médiane est de 32,8 cm. Les circonférences scrotales varient de 26,0 à 41,5 cm.

Graphique 1 : Circonférences scrotales (CS) des 76 béliers (en cm) en fonction de leur âge (en années). Statut JSRV: positif (●), négatif (◇). Les seuils de CS normale en fonction de l'âge sont indiqués en rouge



La circonférence scrotale augmente avec l'âge (ANOVA, $p < 0,001$). Les moyennes (\pm écart-type) des circonférences scrotales sont de $31,0 \pm 2,2$ cm, $36,3 \pm 1,9$ cm et $37,8 \pm 2,1$ cm, respectivement pour les béliers de moins de 1,5 an, entre 1,5 et 2,5 ans et de plus de 2,5 ans.

Le statut virologique JSRV n'a pas de répercussion sur la circonférence scrotale (Graphique 1). En effet, les béliers positifs ont des circonférences scrotales de 31,5 et 33,0 cm pour la classe d'âge inférieure à 1,5 an, 36,0 cm pour la classe entre 1,5 et 2,5 ans et 35,0 et 39,0 cm pour un âge supérieur à 2,5 ans.

La circonférence scrotale dépend de la race (Söderquist et al., 2006), de l'âge et de la maturité sexuelle des béliers. Tous les animaux de l'étude étaient de race Causse du Lot et avaient atteint la puberté. Il n'existe pas d'abaque définissant les mesures de circonférence scrotale en fonction de l'âge chez les béliers Causse du Lot. Mais, d'une façon générale, chez les béliers de moins de 16 mois, une circonférence scrotale inférieure ou égale à 29 cm est jugée insuffisante (Van Metre, 2012), ce qui représente 10 individus de notre étude sur 51. Pour les béliers de plus de 16 mois, le seuil de circonférence scrotale jugé acceptable est de 33 cm. Seul un bélier de l'étude a une circonférence scrotale en dessous de ce seuil.

La circonférence scrotale est corrélée avec la production spermatique (Boussena, 2014). Elle est diminuée lors d'hypoplasie ou de dégénérescence testiculaire (Ott, 1987). L'époque de l'année influence également la circonférence scrotale chez les espèces saisonnières comme les ovins. Cette valeur est maximale en été et minimale vers le mois de février (Mickelsen et al., 1982). L'étude ayant eu lieu entre octobre et novembre, les circonférences scrotales sont les plus élevées.

2.5 Qualité de la semence

Les paramètres séminologiques suivants ont été enregistrés pour les 72 béliers : le volume de l'éjaculat, la motilité massale, la motilité individuelle, la concentration de l'éjaculat en spermatozoïdes, le nombre de spermatozoïdes par éjaculat et le pourcentage de spermatozoïdes anormaux (tableau 10). La motilité massale et la motilité individuelle n'ont pas pu être déterminées pour respectivement 3 et 5 béliers, en raison de la formation d'un gel rapidement après la collecte.

Tableau 10 : Paramètres séminologiques des 72 béliers (Moyenne \pm ET), médiane et étendue

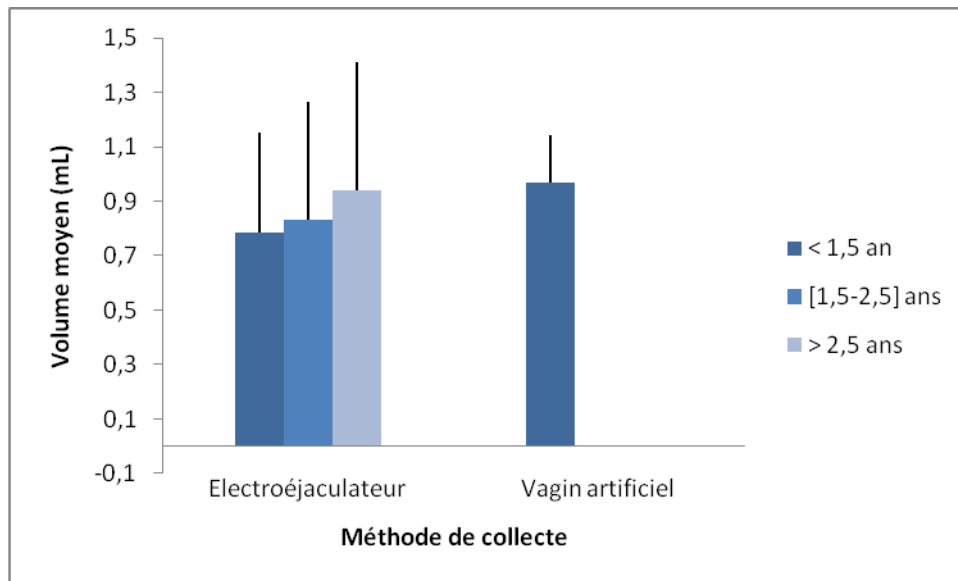
	Nombre de béliers	Moyenne \pm écart type	Médiane	Etendue	Norme
Volume d'éjaculat (mL)	72	0,85 \pm 0,40	0,8	[0,3-2]	[0,5 – 1,5]
Motilité massale	72	3,21 \pm 1,72	3,25	[0 ; 5]	> 2
Motilité individuelle (%)	71	50,8 \pm 25,01	60	[0,0 ; 80,0]	> 40
Concentration de l'éjaculat (*10⁹/mL)	72	2,31 \pm 1,75	1,98	[0,11-8,67]	[1 – 5]
Spermatozoïdes / éjaculat (*10⁹)	72	1,52 \pm 1,05	1,5	[0,13 ; 4,3]	> 1,2
Spermatozoïdes anormaux (%)	72	2,7 \pm 1,97	2,5	[0,0 ; 9,5]	< 20

Le volume moyen (\pm écart-type) des éjaculats de l'ensemble des béliers était de 0,85 \pm 0,40 mL. Il a varié de 0,3 mL à 2 mL. En moyenne, la concentration d'un éjaculat en spermatozoïdes était élevée, de 2,31 \pm 1,75 milliards par millilitre. La motilité massale moyenne était de 3,21 \pm 1,72. Seulement 15 béliers ont une motilité massale insuffisante (\leq 2). La motilité individuelle moyenne (\pm écart-type) était de 50,8 \pm 25,01 %. Le pourcentage de spermatozoïdes anormaux était relativement faible et s'étendait de 0 à 9,5 avec une moyenne de 2,7 \pm 1,97 %.

2.5.1 Volume de l'éjaculat

Dans notre étude, le volume de l'éjaculat n'a pas été significativement influencé par l'âge (0,83 \pm 0,43 mL; 0,83 \pm 0,21 mL et 0,94 \pm 0,44 mL, respectivement pour les béliers de moins de 1,5 an, de 1,5 à 2,5 ans et de plus de 2,5 ans (Figure 7)). La méthode de collecte n'a pas eu d'impact sur le volume spermatique, qui était de 0,84 \pm 0,42 mL avec l'électroéjaculateur et 0,76 \pm 0,42 mL avec le vagin artificiel (ANOVA, NS). En effet, à l'électroéjaculateur, les éjaculats ont été obtenus dès les premières impulsions (en moyenne après 12,2 \pm 4,4 impulsions), ce qui n'a pas conduit à une stimulation excessive des glandes annexes et à une augmentation de volume de l'éjaculat.

Figure 7 : Influence de la méthode de collecte et de la classe d'âge des 72 béliers sur le volume moyen de sperme récolté (en mL)



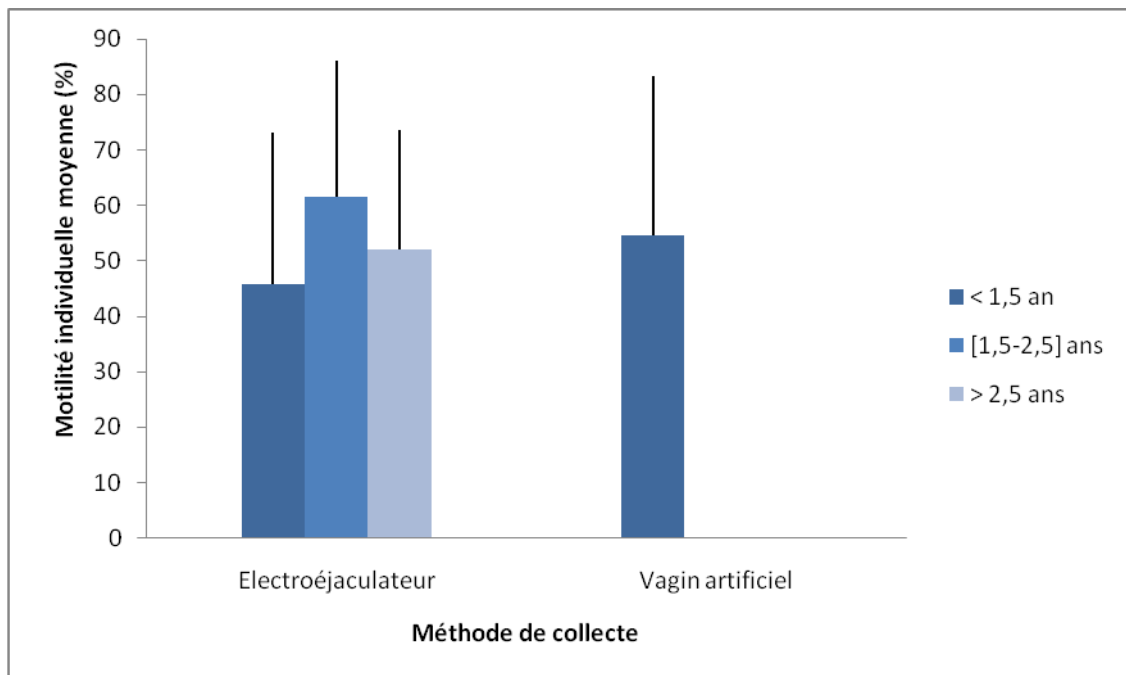
Une tendance à la diminution du volume moyen de l'éjaculat a été observée chez les 5 béliers positifs vis-à-vis du JSRV comparativement aux 67 béliers sains ($0,56 \pm 0,26$ mL versus $0,86 \pm 0,42$ mL, ANOVA, $p=0,074$). Toutefois, il est difficile de déterminer si cet effet du statut pathologique sur le volume a une signification biologique compte tenu du faible effectif des béliers positifs vis-à-vis du JSRV.

Dans notre étude, les volumes des éjaculats sont dans les valeurs usuelles pour 87,5 % des béliers. Parmi les trois béliers ayant un volume spermatique faible, un seul a été collecté au vagin artificiel et les autres ont été prélevés à l'électroéjaculateur. Ces trois béliers avaient tous 1,21 an ce qui pourrait expliquer au moins en partie le faible volume récolté.

2.5.2 Motilité individuelle

La figure 8 présente la motilité individuelle des béliers en fonction de leur âge et de la méthode de collecte.

Figure 8 : Influence de la méthode de collecte et de la classe d'âge des 72 béliers sur la motilité individuelle moyenne des spermatozoïdes (en pourcentage)

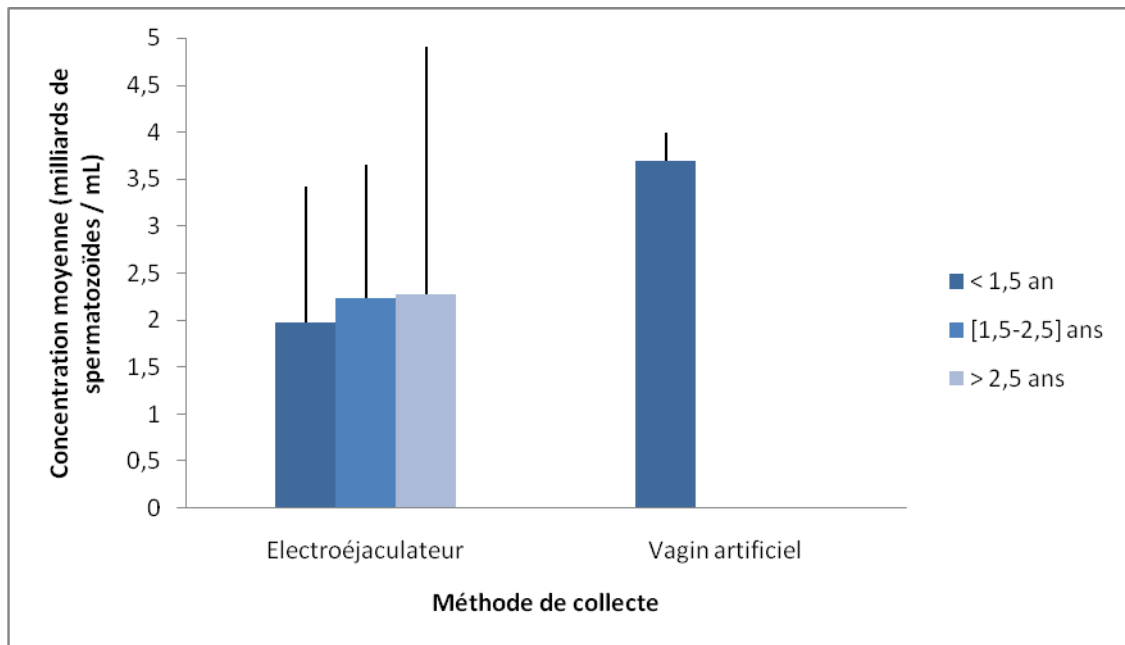


Aucun des facteurs évalués (âge, méthode de collecte, statut pathologique, ANOVA, NS) n'a eu d'impact sur la motilité individuelle des éjaculats. La motilité individuelle moyenne (\pm écart-type) est de $47,7 \pm 25,0$ %, $61,5 \pm 23,0$ %, $52,1 \pm 25,7$ %, respectivement pour les classes d'âge suivantes, moins de 1,5 an, entre 1,5 et 2,5 ans, plus de 2,5 ans. La méthode de collecte n'a pas eu d'effet sur la motilité individuelle ($50,1 \pm 25,6$ % et $54,6 \pm 21,8$ %, respectivement pour la collecte à l'électroéjaculateur et au vagin artificiel). Les 5 béliers chez lesquels JSRV a été détecté dans la semence avaient une motilité individuelle moyenne non significativement différente des animaux non porteurs de $51,0 \pm 27,9$ % versus $50,7 \pm 25,0$ % pour les 67 béliers n'excrétant pas JSRV.

Parmi les 22 béliers qui avaient une motilité individuelle inférieure aux valeurs de référence de 40-50 % (Boundy, 1998), la majorité (20) a été collectée à l'électroéjaculateur et un seul était porteur de JSRV dans son sperme. Seize de ces béliers avaient moins de 1,5 an. Vingt d'entre eux avaient une circonférence scrotale normale, comprise entre 33 et 39 cm.

2.5.3 Concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat

Figure 9 : Influence de la méthode de collecte et de la classe d'âge des 72 béliers sur la concentration moyenne en spermatozoïdes (en milliards par mL)



La concentration moyenne (\pm écart-type) en spermatozoïdes n'a pas été influencée par l'âge, elle est de $2,33 \pm 1,72$ milliards par millilitre, $1,65 \pm 1,41$ milliards par millilitre et $3,19 \pm 1,46$ milliards par millilitre, respectivement pour les classes d'âge suivantes, moins de 1,5 an, entre 1,5 et 2,5 ans et plus de 2,5 ans (Figure 9).

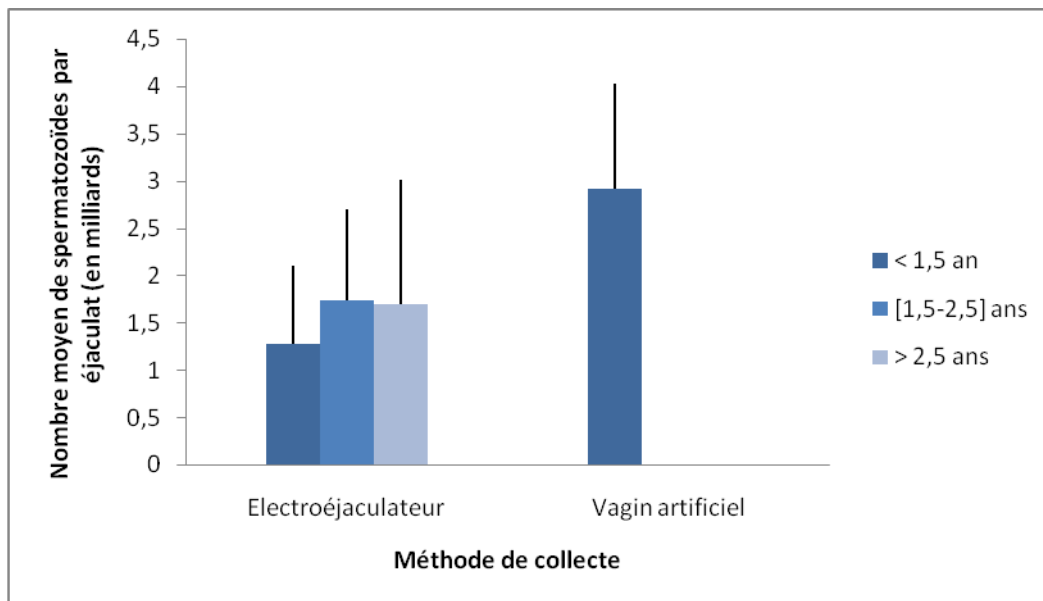
La concentration en spermatozoïdes est significativement plus faible pour les éjaculats collectés à l'électroéjaculateur ($2,08 \pm 1,61$ milliards de spermatozoïdes par millilitre) comparativement à ceux récoltés au vagin artificiel ($3,70 \pm 1,99$ milliards par millilitre, ANOVA, $p = 0,003$). En effet, l'électroéjaculation peut conduire à une moins bonne stimulation et à l'obtention d'un éjaculat de qualité moyenne. En outre, la stimulation des glandes peut conduire à une dilution du sperme (Rigal, 2008).

Le statut virologique n'a pas eu d'effet sur la concentration en spermatozoïdes des éjaculats. La concentration moyenne des éjaculats des 5 béliers porteurs de JRSV est de $3,44 \pm 3,26$ milliards par millilitre, et celle des 67 béliers sains, de $2,22 \pm 1,59$ milliards par millilitre (ANOVA, NS).

2.5.4 Nombre de spermatozoïdes par éjaculat

La figure 10 présente le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat des béliers en fonction de leur âge et de la méthode de collecte.

Figure 10 : Influence de la méthode de collecte et de la classe d'âge des 72 béliers sur le nombre moyen de spermatozoïdes par éjaculat (en milliards)



Le nombre moyen (\pm écart-type) de spermatozoïdes par éjaculat est de $1,61 \pm 1,08$ milliards, $1,74 \pm 0,72$ milliards et $1,70 \pm 1,25$ milliards, respectivement pour les classes d'âge suivantes, moins de 1,5 an, entre 1,5 et 2,5 ans, plus de 2,5 ans. Les éjaculats récoltés à l'électroéjaculateur contenaient une quantité de spermatozoïdes ($1,44 \pm 0,93$ milliards de spermatozoïdes) significativement inférieure à ceux collectés au vagin artificiel ($2,92 \pm 0,84$ milliards, ANOVA, $p < 0,001$).

Le statut virologique n'a pas eu d'effet sur le nombre total de spermatozoïdes des éjaculats, qui était de $1,67 \pm 1,65$ milliards pour les 5 béliers porteurs de JRSV et de $1,65 \pm 1,01$ milliards pour les 67 béliers sains (ANOVA, NS).

2.5.5 Taux de viabilité des spermatozoïdes

Le taux de viabilité des spermatozoïdes a été évalué sur l'ensemble des lames par deux personnes (Docteur Patricia Ronsin et moi-même, Photographie 6). La répétabilité interindividuelle était satisfaisante pour la majorité des frottis, avec un CV de 12,4% et une étendue de 5 à 42,3%, avec 27 lames sur 98 (28 %) ayant un CV supérieur à 20 %.

Pour l'ensemble des béliers, la moyenne et l'écart-type des taux de spermatozoïdes vivants est de $39,0 \pm 21,6$ %. Ces valeurs vont de 3 % pour les moins bons éjaculats à 84,5 % pour les meilleurs éjaculats, avec une médiane à 39,3 %.

Photographie 6 : Image microscopique de trois spermatozoïdes morts et un vivant (x 100)

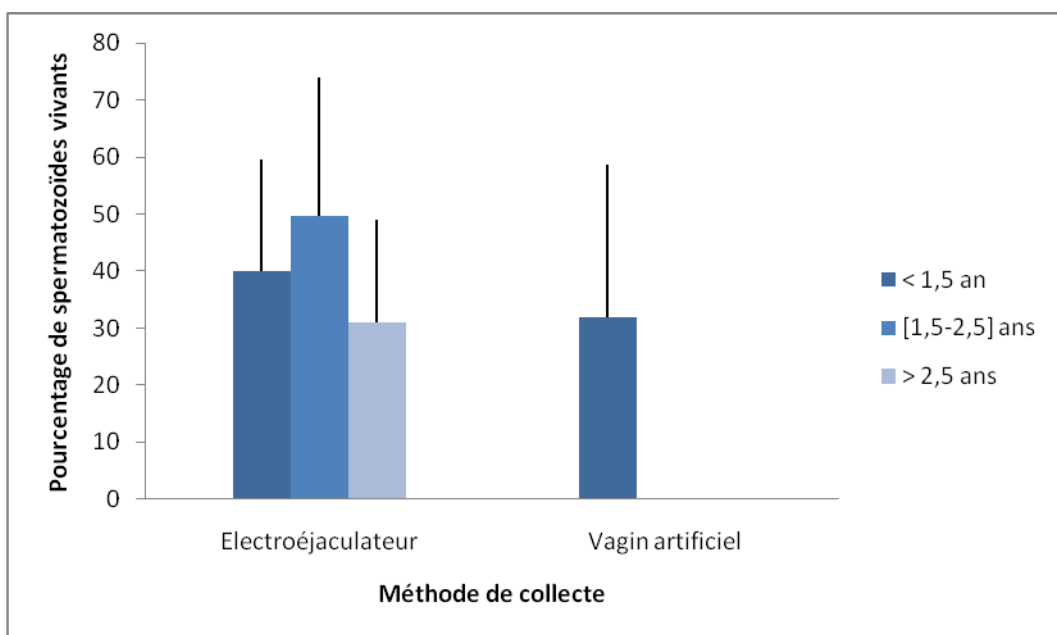


* : spermatozoïde mort
 + : spermatozoïde vivant

La présence de JSRV dans le sperme n'avait pas d'influence sur la viabilité des spermatozoïdes (ANOVA, NS). Le taux de viabilité spermatique moyen (\pm ET) est de $39,6 \pm 22,08$ % chez les béliers négatifs et de $31,8 \pm 13,7$ % pour les 5 béliers positifs pour JSRV.

Les éjaculats des béliers entre 1,5 et 2,5 ans présentaient un pourcentage de spermatozoïdes vivants ($53,6 \pm 21,4$ %) qui tend à être plus élevé que ceux des béliers de moins de 1,5 an ou de plus de 2,5 ans ($38,5 \pm 22,5$ % et $30,5 \pm 15,7$ %, respectivement, ANOVA, $p = 0,06$, (Figure 9)).

Figure 9 : Influence de la méthode de collecte et de la classe d'âge des 72 béliers sur le pourcentage de spermatozoïdes vivants



Le pourcentage de spermatozoïdes vivants est de $40,5 \pm 22,0$ % et $36,6 \pm 21,3$ % respectivement chez les béliers collectés à l'électroéjaculateur et au vagin artificiel. La méthode de collecte n'a pas eu d'effet significatif sur le nombre de spermatozoïdes vivants (ANOVA, NS).

De façon surprenante, la motilité individuelle moyenne de l'ensemble des béliers de $50,8 \pm 25,01$ % est supérieure au pourcentage de spermatozoïdes vivants ($39,0 \pm 21,6$ %). Cet écart de 10 % environ pourrait être expliqué par une pénétration du colorant à l'intérieur des spermatozoïdes vivants, avant la lutte des lames, ce qui entraîne une augmentation artéfactuelle du nombre de spermatozoïdes morts. Par ailleurs, un certain nombre de facteurs influencent la viabilité des spermatozoïdes, notamment l'exposition à l'éosine, la concentration en éosine et le temps d'exposition (Eliasson, Treichl, 1971). De même, des conditions hypo-osmotique ou hyper-osmotique affectent la viabilité des spermatozoïdes (Liu, Foote, 1998).

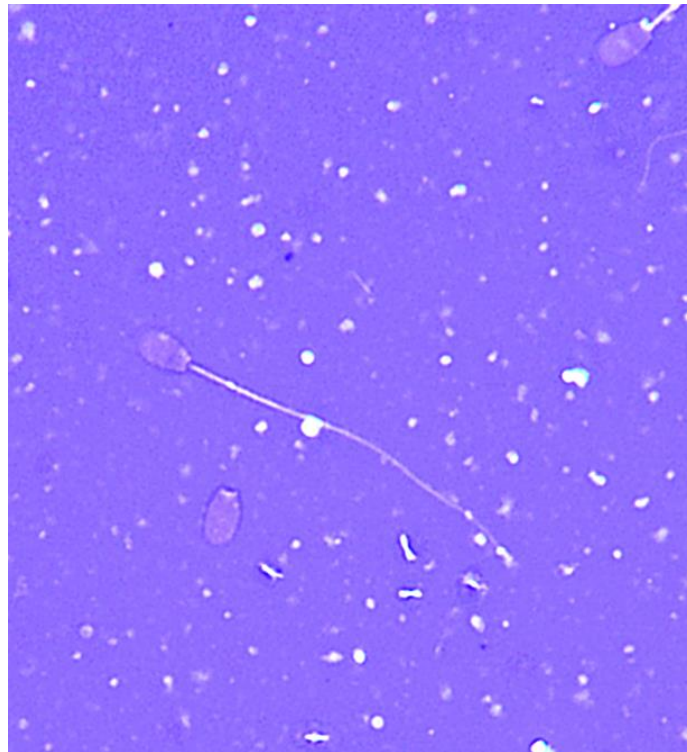
2.5.6 Anomalies spermatiques

L'examen des frottis de semence a permis de mettre en évidence plusieurs anomalies spermatiques présentées en fonction du site :

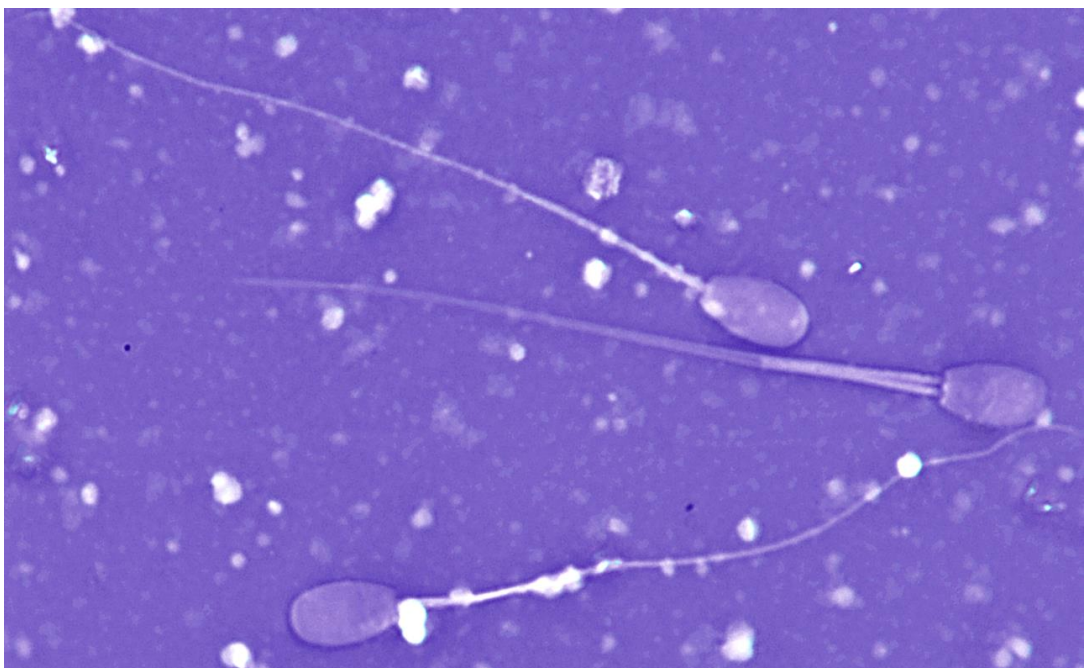
- Tête : détachée, petite ou irrégulière
- Pièce intermédiaire : persistance d'une gouttelette cytoplasmique proximale ou distale, pièce intermédiaire double
- Flagelle : replié, enroulé ou court

L'ensemble des étalements de sperme des béliers a été lu par deux personnes (Docteur Patricia Ronsin et moi-même). La répétabilité interindividuelle des anomalies spermatiques était satisfaisante, avec un CV de 6,2% et une étendue de 0 à 25,7%.

Photographie 7 : Image microscopique d'un spermatozoïde anormal : tête seule (x 40)



Photographie 8 : Image microscopique d'un spermatozoïde anormal : présence d'une pièce intermédiaire double (x 100)



Le tableau 11 présente les taux d'anomalies spermatiques totales, de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle.

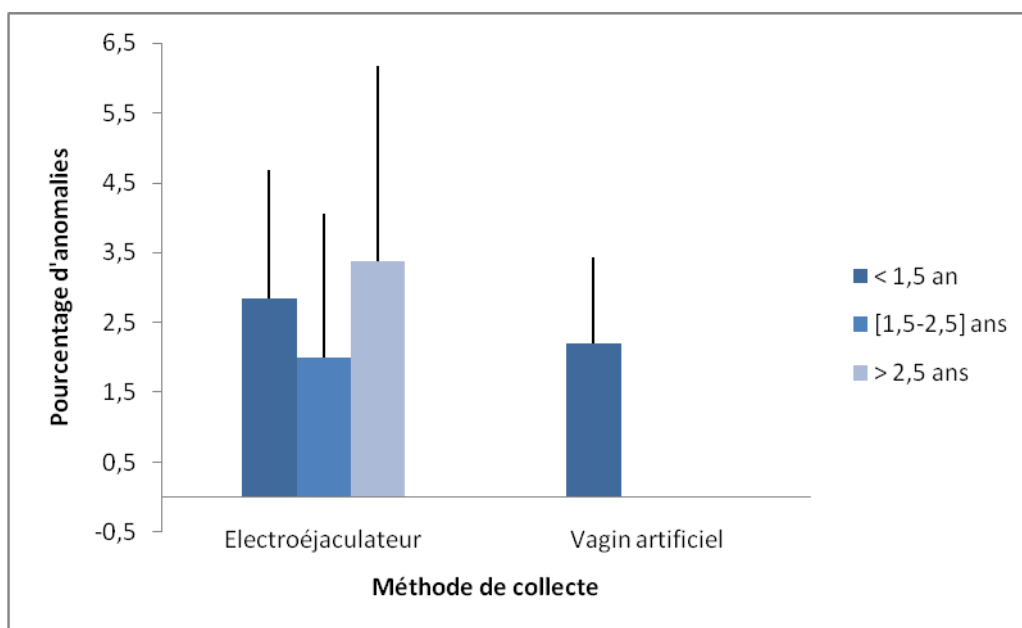
Tableau 11 : Anomalies des spermatozoïdes dans les éjaculats collectés sur les 72 béliers et statut JSRV

Localisation anomalie	Valeurs	JSRV ^{NEG} (n=67)	JSRV ^{POS} (n=5)	Total
Tête	Moyenne ± SD	0,18 ± 0,43	0,14 ± 0,38	0,17 ± 0,43
	Médiane	0	0	0
	Etendue	[0 ; 2]	[0 ; 1]	[0 ; 2]
Pièce intermédiaire	Mean ± SD	0,4 ± 1,2	0,43 ± 0,79	0,42 ± 1,1
	Médiane	0	0	0
	Etendue	[0 ; 10]	[0 ; 2]	[0 ; 10]
Flagelle	Mean ± SD	2,9 ± 2,9	6,1 ± 5,9	3,1 ± 3,3
	Médiane	2	3	2
	Etendue	[0 ; 13]	[2 ; 18]	[0 ; 18]
Spz entier	Mean ± SD	2,6 ± 1,8	3,5 ± 3,4	2,7 ± 2,0
	Médiane	2,5	2,0	2,5
	Etendue	[0 ; 7,5]	[1,5 ; 9,5]	[0 ; 9,5]

Les taux d'anomalies pour l'ensemble des éjaculats des béliers sont relativement faibles. Les anomalies les plus fréquentes sont celles du flagelle ($3,1 \pm 3,3\%$), notamment le repli du flagelle, qui peut correspondre à un artefact lié à l'étalement (Tableau 11).

Ni la méthode de collecte, ni l'âge, ni le statut pathologique n'ont eu d'influence sur le taux d'anomalies spermatiques (ANOVA, NS, Figure 12). Les pourcentages moyens d'anomalies sont de $2,7 \pm 1,8\%$, $2 \pm 1,3\%$ et $3,4 \pm 3,0\%$, respectivement chez les béliers de moins de 1,5 an, entre 1,5 et 2,5 ans et de plus de 2,5 ans. Les individus collectés à l'électroéjaculateur présentent en moyenne $2,7 \pm 2,0\%$ d'anomalies, contre $2,2 \pm 1,7\%$ chez ceux dont le sperme a été prélevé au vagin artificiel (Tableau 11).

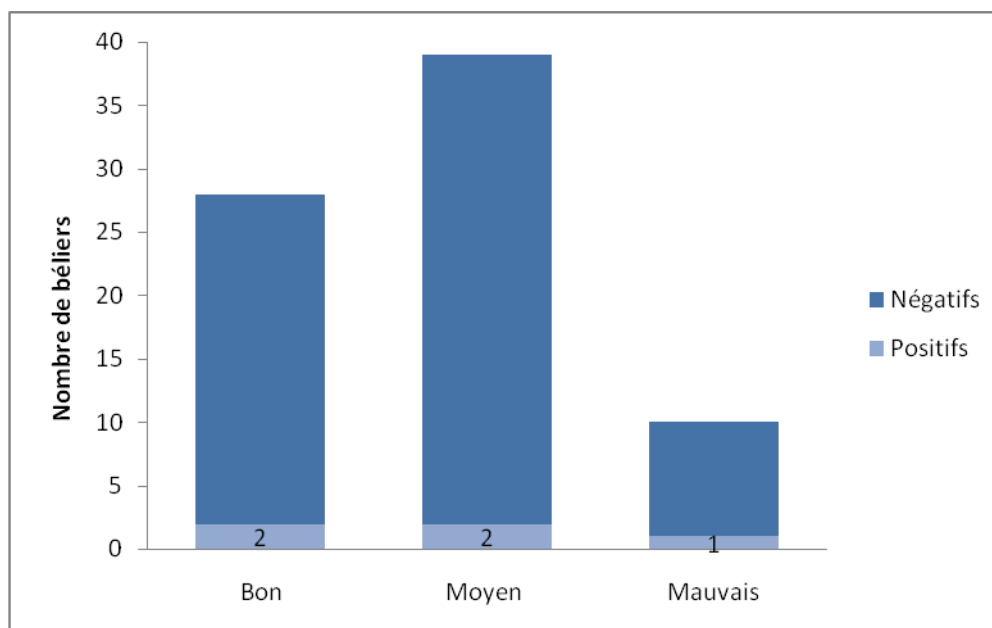
Figure 12 : Influence de la méthode de collecte et de la classe d'âge des 72 béliers sur le pourcentage d'anomalies spermatiques



2.5.7 Score séminologique

Selon les critères définis précédemment (cf paragraphe 1.8), la qualité de la semence est classée en trois catégories : bonne, moyenne ou mauvaise.

Figure 13 : Répartition des 72 béliers selon leur score séminologique et leur statut vis-à-vis de JSRV

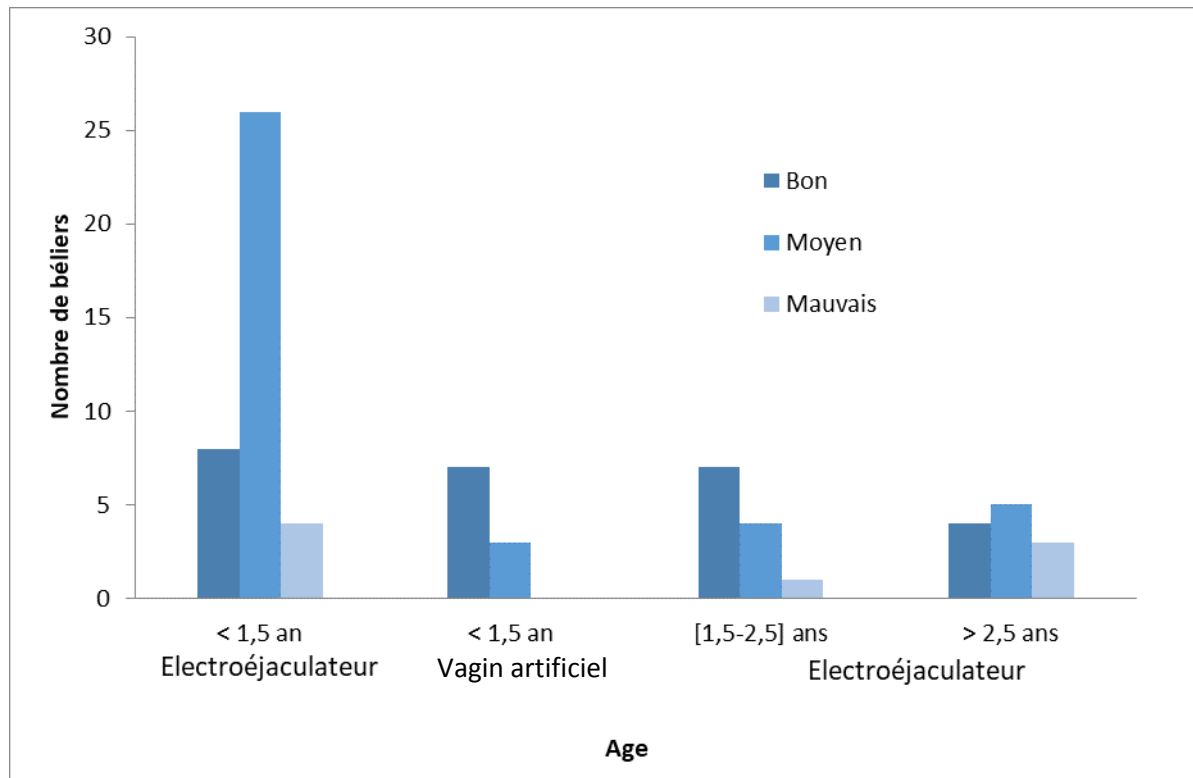


La majorité des béliers (64/72 soit 88,9%) a un score sémiologique satisfaisant. Seuls 8 béliers (soit 11,1 %) ont des paramètres séminologiques mauvais. Un bélier JSRV positif

présentait un score séminologique insuffisant. La présence de JSRV ne semble pas avoir eu d'effet sur le score séminologique.

La figure 14 présente la répartition des 72 béliers en fonction du score séminologique, de la classe d'âge des béliers et de la méthode de collecte.

Figure 14 : Répartition des 72 béliers en fonction du score séminologique et de la méthode de collecte, pour chaque classe d'âge



Pour les béliers collectés à l'électroéjaculateur (n=62), la classe d'âge tend à avoir un effet sur le score séminologique des béliers (Chi-2, p=0,076). Les 38 béliers qui ont entre 0 et 1,5 an ont une semence de bonne qualité, avec seulement 4 béliers ayant un score séminologique insuffisant. En revanche, 68 % des béliers jeunes ont un score séminologique « moyen », ce qui peut s'expliquer par un manque de maturité sexuelle. Pour les béliers âgés de 1,5 à 2,5 ans, un seul bélier sur 12 est classé dans la catégorie « mauvais ». En revanche, cette proportion est plus élevée pour les béliers les plus âgés, trois béliers sur 12 ont un score séminologique « mauvais » (Figure 14).

Pour l'ensemble des béliers jeunes (<1,5 an), la méthode de collecte a eu un effet sur le score séminologique (Chi2, p=0,011). 70 % des dix jeunes béliers collectés au vagin artificiel ont un score sémiologique classé « bon » et aucun bélier n'appartient à la catégorie « mauvais ». En revanche, pour les 38 jeunes béliers prélevés à l'électroéjaculateur, la majorité (26 ; 68,4 %) d'entre eux a un score « moyen » et 4 (10,5 %) ont un score « mauvais » (Chi-2, p=0,011) (Figure 14).

Cet effet de la méthode de collecte sur le score séminologique a déjà été observé chez le taureau (Rigal, 2008). En effet, l'électroéjaculation entraîne une stimulation de la sécrétion

des glandes qui dilue la semence. Au contraire, le vagin artificiel mime les conditions physiologiques et permet d'obtenir une meilleure stimulation et par conséquent une semence plus concentrée et de meilleure qualité (Foster et al., 1970 ; Léon et al., 1991). De plus, lors de collecte de sperme à l'électroéjaculateur, l'érection n'est pas systématiquement présente, ce qui diminue la qualité de la semence obtenue car elle peut se contaminer dans le fourreau (Palmer et al, 2005).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES SUR LE CONTROLE DE L'INFECTION PAR LE JSRV

Notre étude a été réalisée dans des conditions terrain sur 78 béliers répartis dans un centre d'insémination artificielle et 2 élevages sélectionneurs. Les caractéristiques des animaux (âge) étaient différentes en fonction des élevages. Par ailleurs, la méthode de collecte avec vagin artificiel n'a été utilisée qu'au centre d'IA et sur de jeunes béliers, ce qui a conduit à un plan expérimental différent pour les béliers testés. Dans cette étude, nous avons cherché à établir s'il existait une corrélation entre la qualité des fonctions sexuelles et le statut vis-à-vis du virus JSRV, établi par détection de génome viral dans le sperme. Sur la base d'une faible prévalence d'infection chez les 72 béliers analysés, notre étude a montré que la présence du virus dans le sperme n'était associée ni à des lésions génitales, ni à une altération de la qualité séminologique. Nous avons observé un effet de l'âge sur la circonférence scrotale et un effet de la méthode de collecte sur la qualité séminologique.

Le JSRV appartient à la famille des *Retroviridae* qui regroupe des virus à ARN enveloppés dont la réplication dépend de la reverse transcriptase. Parmi les rétrovirus, HIV-1 est transmis par voie et excrété de façon intermittente dans le sperme des hommes séropositifs (Gupta et al., 2000). Ainsi, chez quatre-vingt-dix pourcents des hommes ne recevant pas de traitement, des particules virales libres sont retrouvées dans le liquide séminal (Tachet et al., 1999).

Plusieurs études ont été conduites afin d'évaluer l'influence de la présence d'HIV-1 dans le sperme sur la fertilité des hommes, mais les résultats sont contradictoires. Certaines études montrent une altération des paramètres spermatiques (volume d'éjaculat, concentration en spermatozoïdes, motilité massale et motilité individuelle) chez les individus séropositifs (Nicoopoulos et al., 2004), avec cependant des valeurs qui restent dans les valeurs basses considérées par l'OMS comme normales (Garrido et al., 2005). Des cas d'orchites, d'hypogonadisme et d'azoospermie ont été fréquemment décrits chez des hommes infectés par HIV-1 (Dejucq-Rainsford, Jegou, 2004). Une altération de la mobilité des spermatozoïdes, une augmentation du nombre de cellules non spermatiques et une diminution du volume d'éjaculat ainsi que du nombre de spermatozoïdes totaux ont été mises en évidence chez environ trente pourcents des hommes infectés par HIV (Dulioust et al., 2002). Ces effets délétères sur la spermatogenèse pourraient être dus à la réaction inflammatoire induite par le HIV-1 (Leruez-Ville et al., 2005). En outre, les traitements antiviraux pourraient eux-mêmes avoir un effet délétère sur la qualité du sperme (Dulioust et al., 2002). Il est donc difficile de déterminer si les modifications spermatiques observées sont dues à l'infection par le HIV-1 ou à la trithérapie (Dulioust et al., 2002). Par ailleurs, une thérapie antirétrovirale efficace permet de diminuer la charge virale retrouvée dans le sperme en quelques semaines (Leruez-Ville, 2002), ce qui pourrait en retour limiter les effets néfastes du virus sur la qualité de la semence et sa transmission lors d'un rapport sexuel ou de l'insémination artificielle.

Les SRLV (Small Ruminant LentiVirus) sont des rétrovirus infectant les petits ruminants domestiques et responsables de maladies inflammatoires chroniques et/ou dégénératives du poumon, de l'articulation, de la glande mammaire ou du système nerveux central (Leroux et al., 2010). Appartenant au genre lentivirus, les SRLV sont apparentés à HIV.

L'ADN proviral du CAEV est retrouvé dans le sperme des boucs et plus précisément dans les monocytes et les macrophages, mais n'altère pas le fonctionnement testiculaire ou épидidymaire, ni de la fertilité du sperme (Ali Al Ahmad, 2007).

La transmission des SRLV chez les ovins peut être possible *via* la semence des béliers, car il est retrouvé dans l'éjaculat. Des études ont montré que les SRLV étaient à l'origine de lésions testiculaires (Palfi et al., 1989). En effet, chez les individus atteints, le parenchyme testiculaire est infiltré de lymphocytes, d'histiocytes et de plasmocytes, une fibrose est également observée. Les tubes séminifères sont atrophiés, ce qui conduit à une altération de la spermatogenèse (Palfi et al., 1989).

Chez les petits ruminants, d'autres agents pathogènes ont un tropisme génital et peuvent altérer la qualité de la semence. C'est notamment le cas de *Brucella ovis* agent de la brucellose chez le bélier qui entraîne une épидидymite contagieuse associée à une perte de la fertilité (Trouche, 2013).

Le virus BTV (Blue Tongue Virus) de la famille des Orbivirus est excrété dans le sperme des ruminants. Des études réalisées chez les taureaux montrent que l'infection par BTV-8 entraîne une baisse de production de la semence (Esnault, 2008), une diminution de la libido et une dégradation des paramètres qualitatifs des éjaculats tels que mobilité spermatique, pourcentage de spermatozoïdes vivants, taux d'anomalies spermatiques supérieur à soixante-dix pourcents (Viville, 2010). Cette altération de la semence peut être imputable à l'hyperthermie causée par la maladie et à des microlésions vasculaires du système reproducteur (Viville, 2010). Ainsi, l'infertilité liée à la phase aiguë de la maladie ne semble pas persister au-delà de quelques mois (Sicard et al., 2009).

Chez le bélier, l'infection naturelle par le BTV-8 a un impact négatif transitoire sur la qualité du sperme notamment sur la mobilité et la concentration spermatique, entraînant une infertilité (Kirschvink et al., 2009). Chez le bélier, la guérison est complète 85 jours après une infection expérimentale. Mais compte tenu de la durée de spermatogenèse, la qualité de la semence est altérée entre 63 et 138 jours après le diagnostic clinique (Kirschvink et al., 2009).

En définitive pour les agents pathogènes qui ont un tropisme génital, il semble que les effets de l'infection sur la qualité de la semence soient surtout liés à un pic d'hyperthermie qui peut accompagner l'infection et altérer la spermatogenèse temporairement. Les effets irréversibles sur la semence sont surtout liés à la sévérité des lésions induites sur le tractus génital. Ainsi, pour les virus lents dont l'infection chronique n'est pas associée à des lésions génitales, il ne semble pas y avoir de lien entre la présence du virus dans la semence et la qualité spermatique.

Quels sont les moyens de contrôle de l'infection par le Jaagsiekte Sheep Retrovirus ?

L'infection par le JSRV est responsable de l'apparition d'une tumeur contagieuse du poumon des moutons et des chèvres, appelée adénocarcinome pulmonaire ovin. Après une évolution très lente, des difficultés et des bruits respiratoires apparaissent, l'animal maigrit et un jetage abondant vient compléter ce tableau clinique.

Le JSRV est responsable d'une infection persistante, associée à l'intégration définitive de son génome dans le génome de l'hôte durant les premières étapes de sa réplication. Par conséquent, un animal infecté le restera jusqu'à sa mort. Comme pour les autres infections rétrovirales, il n'existe jusqu'à présent aucun traitement et aucun vaccin permettant de protéger la population ovine et d'empêcher la transmission du virus. Ainsi, la maladie est en extension importante ces dernières années, notamment en région Occitanie. La transmission étant principalement aéroportée (Suau et al., 2006) via des particules aérosolisées, la maîtrise

de la maladie est difficile et les troupeaux peuvent se contaminer par contact avec des troupeaux ovins infectés, notamment en pâture.

Jusqu'à présent, il n'existe pas de test diagnostique précoce, utilisable en routine, sur l'animal vivant. Le diagnostic clinique est tardif et fondé sur un écoulement nasal de liquide pulmonaire et des signes respiratoires à l'auscultation, ce qui ne permet pas d'écarter rapidement ces animaux du cheptel, et contribue à l'extension de l'infection. Il en va de même pour les individus porteurs sains qui ne développeront pas de forme clinique de la maladie, mais qui peuvent transmettre le virus.

La présence de multiples copies de formes endogènes du JSRV (enJSRV) chez tous les ovins et caprins complexifie la définition d'outils moléculaires utilisables pour assurer la spécificité de la détection. En effet, les formes enJSRV, qui n'auraient pas de rôle dans l'induction de la maladie, ressemblent beaucoup génétiquement au virus exogène JSRV. C'est pourquoi, des amorces de PCR spécifiques des formes exogènes ont été développées (Leroux et al, manuscrit en préparation), limitant ainsi la détection de faux positifs.

La maîtrise de l'infection nécessite de bloquer le plus précocement possible la chaîne de transmission. Pour cela, il faut éliminer les animaux infectés, maîtriser les facteurs de risque et contrôler les facteurs de sensibilité des animaux. Actuellement, la seule solution de maîtrise est d'éliminer les individus déclarant une forme clinique de la maladie (Pépin et al., 2004). Malheureusement, cette mesure intervient tard, quand l'animal a déjà pu contaminer ses congénères. Le développement de tests permettant de mettre en évidence précocement les individus virémiques serait une avancée déterminante dans la lutte contre le JSRV. Mais la seule solution de maîtrise qui pourrait alors être envisagée serait d'abattre massivement l'ensemble des individus virémiques, ce qui constituerait une perte très importante pour les éleveurs, au moins pendant le temps nécessaire pour assainir l'ensemble des troupeaux et ainsi contribuer à l'éradication de la maladie. Par ailleurs, si la prévalence se révèle être élevée, dans certaines zones et dans certains élevages, l'éradication de la maladie serait certainement très coûteuse et pourrait entraîner une perte importante de la base de sélection, en particulier pour des bassins atteints, comme les Causses du Lot.

En conclusion, une transmission de JSRV par la semence de béliers lors de la saison de reproduction ne peut, actuellement, pas être écartée. Une étude pourrait être réalisée pour évaluer la transmission du virus à des femelles saines, par la saillie ou l'insémination, en utilisant du sperme de béliers excréant le JSRV. Les femelles et leurs produits seraient alors suivis pour évaluer une éventuelle virémie ou le développement de la maladie.

Par ailleurs, une sensibilité génétique de cette maladie n'est pas exclue. Pour approfondir cette piste génétique, il faudrait collecter des informations précises sur les données phénotypiques et sur la filiation des animaux, qui n'est malheureusement connue que pour environ un tiers des animaux de race Causse du Lot. L'exploration des génomes d'animaux sensibles et d'autres résistants pourrait ensuite permettre de détecter la présence de gènes de résistance à la maladie et de sélectionner les individus résistants.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

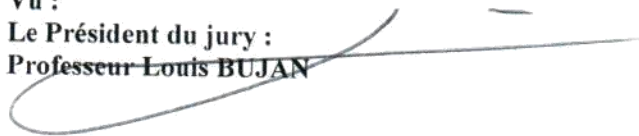
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, **Nicole HAGEN-PICARD**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Sophie PERRIN** intitulée « **Adénocarcinome pulmonaire ovin : excrétion du virus dans le sperme et impact sur la fonction sexuelle des béliers** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 17 mai 2019
Professeur Nicole HAGEN-PICARD
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

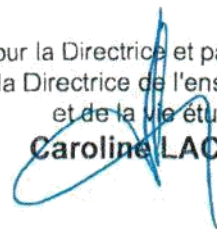


Vu :
Le Président du jury :
Professeur Louis BUJAN



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

Pour la Directrice et par délégation,
la Directrice de l'enseignement
et de la vie étudiante
Caroline LACROUX



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



BIBLIOGRAPHIE

ALI AL AHMAD M.Z., FIENI F., PELLERIN J.L., GUIGUEN F., CHEREL Y., CHATAGNON G., BOUZAR A.B., CHEBLOUNE Y., 2008. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology*, 69, 473-480.

BARONE R., 1990. Appareil génital mâle. *Anatomie comparée des mammifères domestiques Tome 4 Splanchnologie II*, 89-267. Paris : VIGOT. P 89-267. ISBN 9782711481880.

BARRET J.P., 1992. *Zootecnie générale*. Paris : LAVOISIER, TEC ET DOC. 180p. ISBN 9782743014018

BARTH A.D., 2007. *Chapter 31 - Evaluation of potential breeding soundness of the bull*. Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2nd Edition. Philadelphia, Saunders : THRELFALL, W.R. et YOUNGQUIST R.S. p 228-240. ISBN 9780721693231.

BARTH A.D., ALISIO L., AVILES M., ARTEAGA A.A., CAMPBELL J.R., HENDRICK S.H., 2008. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. *Animal Reproduction Science*, 106, 274-288.

BOUNDY T., 1998. Collection and interpretation of ram semen under general practice conditions. *Sheep and goat practice*, 2, 19-31.

BOUSSENA S., AIMEUR R., HIRECHE S., BOUAZIZ O., TAINTURIER D., 2014. Contrôle des performances de reproduction (corporelles, testiculaires et spermatiques) chez les antenais de race *Ouled Djellal* de la puberté jusqu'à la mise à la reproduction. *Revue de médecine vétérinaire*, 165, 289-296.

CAPORALE M., CENTORAME P., GIOVANNINI A., SACCHINI F., DI VENTURA M., DE LAS HERAS M., PALMARINI M., 2005. Infection of lung epithelial cells and induction of pulmonary adenocarcinoma is not the most common outcome of naturally occurring JSRV infection during the commercial lifespan of sheep. *Virology*, 338, 144-153.

CARLSON J., LYON M., BISHOP J., VAIMAN A., CRIBIU E., MORNEJX J. F., BROWN S., KNUDSON D., DEMARTINI J., LEROUX C., 2003. Chromosomal distribution of endogenous Jaagsiekte sheep retrovirus proviral sequences in the sheep genome. *Virology*, 77, 9662-9668.

CIIRPO, 2009. *Problème de fertilité en lutte naturelle : causes possibles et remèdes* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://idele.fr/rss/publication/idelesolr/recommends/probleme-de-fertilite-en-lutte-naturelle-causes-possibles-et-remedes.html> (consulté le 15 Janvier 2018).

CIIRPO, 2016. *Effets de l'état corporel des brebis à la lutte sur leur fertilité en lutte naturelle d'automne*. (en ligne). Disponible à l'adresse : <http://www.inn-ovin.fr/wp-content/uploads/2016/03/NEC-fertilite-C3%A9-v2.pdf> (consulté le 28 Décembre 2017).

Coopérative de l'AIGLE : *Présentation de la coopérative de l'AIGLE* (en ligne). Disponible à l'adresse : <http://www.cia-laigle.com/laboratoire.htm> (consulté le 18 Février 2018).

COULTER G.H., FOOTE R.H., 1979. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle. *Theriogenology*, 11, 297-311.

CUPPS P.T., 1991. *Reproduction in domestic animals*. 4th edition, New York : Academic Press. 670 p. ISBN 0-12-196575-9.

DEJUCQ-RAINSFORD N. , JEGOU B., 2004. Viruses in semen and male genital tissues – consequences for the reproductive system and therapeutic perspectives. *Current Pharmaceutical Design*, 10, 557-575.

DELLMAN H.D., EURELL J., 1998. Textbook of Veterinary Histology, 5th edition. *The Canadian Veterinary Journal*, 48, 414-415.

DULIOUST E., DU A.L., COSTAGLIOLA D., GUIBERT J., KUNSTMANN J.M., HEARD I., et al, 2002. Semen alterations in HIV-1 infected men. *Human Reproduction*, 17, 2112–2118.

ELIASSON R., TREICHL M.B., 1971. Supravital staining of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 22, 134- 137.

ESNAULT O., 2008. *Étude sur l'analyse de risque de la Fièvre Catarrhale Ovine (Bluetongue) dans le bassin ovin laitier de Roquefort : cas particulier des centres d'insémination artificielle*. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse 3, 88 p.

FOSTER J., ALMQUIST J.O., MARTIG R.C., 1970. Reproductive capacity of beef bulls. Changes in sexual behavior and semen characteristics among successive ejaculations. *Journal of Animal Science*, 245-252.

GARRIDO N., MESEQUER M., REMOHI J., SIMON C., PELLICER A., 2005. Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV)- and hepatitis C (HCV)-seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. *Human Reproduction*, 20, 1028-1034.

GINTHER O.J., 1998. Chapter 9 : Bull. *Ultrasonic imaging and animal reproduction in cattle*, Book 3, Equiservices Publishing. 312 p. ISBN 0-9640072-6-6

GNEMMI G., LEFEBVRE R., 2009. Anatomie et ultrasonographie de l'appareil reproducteur du taureau. *Guide pratique d'échographie pour la reproduction des ruminants*, 150-172.

GOULETSOU P.G., AMIRIDIS G.S., CRIPPS P.J., LAINAS T., DELIGIANNIS K., SARATSIS P., FTHENAKIS G.C., 2003. Ultrasonographic appearance of clinically healthy testicles and epididymides of rams. *Theriogenology*, 59, 1959-1972.

GREGO E., DE MENEGHI D., ALVAREZ V., BENITO A., MINGUIJON E., ORTIN A., MATTONI M., MORENO B., PEREZ DE VILLARREAL M., ALBERTI A., CAPUCCHIO M., CAPORALE M., JUSTE R., ROSATI S., DE LAS HERAS M., 2008. Colostrum and milk can transmit jaagsiekte retrovirus to lambs. *Veterinary Microbiology*, 130, 247 -257.

GUPTA P., LEROUX C., PATTERSON B.K., KINGSLEY L., RINALDO C., DING M., CHEN Y., KULKA K., BUCHANAN W., MCKEON B., MONTELARO R., 2000. Human immunodeficiency virus type 1 shedding pattern in semen correlates compartmentalization of viral Quasi species between blood and semen. *Infect Diseases*, 182, 79-87.

HANZEN C., 2014. Sémiologie : La propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants, 27 p.

HOFACRE A., FAN H., 2010. Jaagsiekte Sheep Retrovirus Biology and Oncogenesis. *Viruses*, 2, 2618-2648.

KASTELIC J.P., COOK R.B., PIERSON R.A., COULTER G.H., 2001. Relationship among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 65, 111-115.

KASTELIC J.P., BRITO L.F.C., 2012. Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 45-51.

KIMBERLING C.V., PARSONS G.A., 1997. Breeding soundness evaluation and surgical sterilization of the ram. *Current therapy in large animal Theriogenology*, 620-628.

KIRSCHVINKN et al, 2009. Impact of a natural bluetongue serotype 8 infection on semen quality of Belgian rams in 2007. *The Veterinary Journal*, 182, 244-251.

KNOBIL E., NEILL J., 1988. The reproductive systems - The male. *The Physiology of reproduction 4e Edition*. New York : Raven Press. 2684 p. ISBN 9780123971753.

LEGIFRANCE, 1994. Arrêté du 30 mars 1994 fixant les conditions exigées pour l'agrément sanitaire des centres d'insémination artificielle de l'espèce ovine autorisés au sens de l'article 5 de la loi n° 66-1005 du 28 décembre 1966, pour les béliers utilisés en monte publique artificielle et pour le sperme destiné aux échanges intracommunautaires [en ligne].

Disponible à l'adresse :

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000182735&dateTexte=20170720> (consulté le 7 Mai 2019).

LEON H., PORRAS A.A., GALINA C.S, NAVARRO-FIERRO R., 1991. Effect of the collection method on semen characteristics of zebu and european type cattle in the tropics. *Theriogenology*, 36, 349-355.

LEROUX C., MORNEX J.F., 2008. Retroviral infections in sheep and the associated diseases. *Small Ruminant Research*, 76, 68-76.

LEROUX C., CRUZ J.C.M., MORNEX J.F., 2010. SRLVs : A genetic continuum of Lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. *Current HIV Research*, 8, 94-100.

LERUEZ-VILLE M., DULIOUST E., COSTABLIOLA D., SALMON D., TACHET A., FINKIELSZTEJN L., et al., 2002. Decrease in HIV-1 seminal shedding in men receiving highly active antiretroviral therapy: an 18 month longitudinal study. *AIDS*, 16, 486-488.

LERUEZ-VILLE M., GALIMAND J., GHOSN J., BRIAT A., DELAUGERRE C., CHAIX M.L., 2005. Infection du tractus génital masculin : le point de vue du virologue. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*, 33, 684-690.

LIU Z., FOOTE R. H., 1998. Bull Sperm Motility and Membrane Integrity in Media Varying in Osmolality. *Journal of Dairy Science*, 81, 1868- 1873.

MICKELSEN W.D., PAISLEY L.G., DAHMEN J.J., 1982. Seasonal variations in scrotal circumference, sperm quality, and sexual ability in rams. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181, 376-380.

MONOT M., ARCHER F., GOMES M., MORNEX J.F., LEROUX C., 2015. Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants. *Veterinary Microbiology*, 181, 170-177.

NICOPOULLOS J.D., ALMEIDA P.A., RAMSAY J.W., GILLING-SMITH C., 2004. The effect of human immunodeficiency virus on sperm parameters and the outcome of intrauterine insemination following sperm washing. *Human Reproduction*, 19, 2289–2297.

OIE : Office International des Epizooties, 2008. Chapitre 2.7.10 – Adénomatoses pulmonaires ovines (adénocarcinome). *Manuel terrestre de l'OIE 2008*, 1128-1132.

OTT R.S., 1987. Scrotal circumference : how small is too small ? Proceedings of the Society for Theriogenology, Sept 16-18, Austin, TX, p 1-13.

OTT R.S., MEMON M.A., 1980. Breeding soundness examinations of rams and bucks, a review. *Theriogenology*, 13, 155-164.

PALFI V., GLAVITS R., HAJTOS I., 1989. Testicular lesions in rams infected by maedi/visna virus. *Acta Veterinaria Hungarica*, 37, 97-102.

PALMARINI M., ROSATI S., PITTAU M., ALBERTI A., POZZI S., YORK D.F., SHARP J.M., 2000. An accessory open reading frame (orf-x) of jaagsiekte sheep retrovirus is conserved between different virus isolates. *Virus Research*, 66, 109-116.

PALMER C.W., BRITO L.F.C., ARTEAGA A.A. et al., 2005. Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Animal Reproduction Science*, 87, 25-31.

PARKINSON T.J., MCGOWAN M., 2009. Abnormalities affecting reproductive function of male animals. *Veterinary Reproduction and obstetrics*. 9e edition, England : Elsevier Ltd, p. 635-668.

PEPIN M., VITU C., VALAS S., PERRIN G., RUSSO P., VOGT H.R., BERTONI G., ZANONI R., PETERHANS E., 2004. L'adénomatoses pulmonaires ovines. *Le point vétérinaire*, 248.

PHILIZOT S., 2005. Intérêts et limites de la mesure de la circonférence scrotale pour évaluer la fonction sexuelle du taureau. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse 3, 117 p.

PICARD-HAGEN N., BERTHELOT X., CHAMPION J.L., CORBOZ N., CORDE Y., DRAPEAU A., EON L., LYAZRHI F., MAROIS M., PEGLION M., SCHUSTER A., TROUCHE C., GARIN-BASTUJI B., 2013. Prévention de l'épididymite contagieuse du bélier à *Brucella ovis* : étude préliminaire des relations entre statut sérologique et fonction sexuelle chez le bélier en région PACA. *Journées nationales GTV*, Nantes 2013, 297-301.

PUDNEY J., ANDERSON D., 1991. Orchitis and human immunodeficiency virus type 1 infected cells in reproductive tissues from men with the acquired immune deficiency syndrome. *American Journal of Pathology*, 139, 149–160.

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 3, 99 p.

SCOTT P.R., 2001. Health and production management in sheep flocks. *Herd health : Food Animal Production Medicine*. 3rd edition, Philadelphia : Saunders, p.765-844.

SICARD S., TRANQUARD A., SEGURET A.C., BERTHELOT X., FOUCRAS G., MEYER G., SCHELCHER F., BORDES F., PICARD-HAGEN N., 2009. La fièvre catarrhale ovine a-t-elle un impact sur la fonction sexuelle des taureaux ? *Le nouveau praticien vétérinaire élevages et santé*, 13, 93-98.

SÖDERQUIST L., HULTEN F., 2006. Normal values for the scrotal circumference in rams of Gotlandic breed. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 61-62.

SUAU F., GIRARD N., ARCHER F., COTTIN V., CROZE S., MORNEJX J.F., LEROUX C., 2006. JSRV (*jaagsiekte sheep retrovirus*) et cancer du poumon associé chez le mouton. *Virologie*, 10, 287-299.

STIEVENART M., 1997. L'électroéjaculation chez les mammifères. Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 119 p.

TACHET A., DULIOUST E., SALMON D., DE ALMEIDA M., RIVALLAND S., FINKIELSZTEJN L., et al, 1999. Detection and quantification of HIV-1 in semen: identification of a subpopulation of men at high potential risk of viral sexual transmission. *AIDS*, 13, 823–831.

VAN METRE D.C., RAO S., KIMBERLING C.V., MORLEY P.S., 2012. Factors associated with failure in breeding soundness examination of Western USA rams. *Preventive Veterinary Medicine*, 105, 118-126.

VIVILLE J.S., 2010. Efficacité d'un vaccin inactivé contre une inoculation d'épreuve à BTV-8 réalisée sur des béliers reproducteurs une semaine avant la période officielle de couverture vaccinale : étude clinique, virologique et impact sur la qualité de la semence. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse 3, 86 p.

WATT D.A., 1978. Testicular pathology of Merino rams. *Australian veterinary journal*, 54, 473-478.

NOM : PERRIN

PRENOM : SOPHIE

TITRE : ADENOCARCINOME PULMONAIRE OVIN : PRESENCE DU JAAGSIEKTE SHEEP RETROVIRUS DANS LE SPERME ET IMPACT SUR LA FONCTION SEXUELLE DES BELIERS

RESUME :

La présence du *JaagsiekteSheepRetrovirus* dans le sperme des béliers pose la question de l'impact du virus sur la fonction sexuelle. Une étude terrain a été réalisée sur 78 béliers issus de trois élevages du Lot pour évaluer la relation entre la présence du JSRV dans le sperme et la fonction sexuelle dans des troupeaux infectés. Les paramètres séminologiques ont été évalués après récolte du sperme par électroéjaculation ou au vagin artificiel. Seuls cinq béliers étaient «positifs» vis-à-vis du JSRV. La présence du virus dans le sperme n'a été associée ni à des lésions génitales, ni à une altération de la qualité du sperme. Les éjaculats collectés au vagin artificiel ont présenté une qualité séminologique supérieure à celle obtenue avec l'électroéjaculateur.

Dans l'état actuel des connaissances, la transmission du JSRV par la semence ne peut être écartée, mais l'adénocarcinome ne semble pas avoir d'influence sur la fertilité des béliers.

MOTS-CLES : *JaagsiekteSheepRetrovirus*, adénocarcinome pulmonaire ovin, béliers, fonction sexuelle, sperme

ENGLISH TITLE : OVINE PULMONARY ADENOCARCINOMA : PRESENCE OF JAAGSIEKTE SHEEP RETROVIRUS IN SPERM AND IMPACT ON BREEDING SOUNDNESS OF RAMS.

ABSTRACT :

The presence of *JaagsiekteSheepRetrovirus* in sperm of rams raised the question of its impact on breeding soundness. A field study was performed on 78 rams from 3 herds to evaluate the relationship between the presence of JSRV in sperm and the breeding soundness of rams in infected herds. Sperm parameters were evaluated after semen collected by electroejaculation or artificial vagina. Only five rams were «positive» to the JSRV. The virus presence in sperm did not induced genital lesions or alteration of sperm quality. The sperm quality of the ejaculates collected by artificial vagina was better compared to that obtained with the electroejaculator.

In the current state of knowledge, the transmission of JSRV by semen cannot be ruled out, but adenocarcinoma doesn't seem to impact the fertility of the rams.

KEY WORDS : *JaagsiekteSheepRetrovirus*, ovine pulmonary adenocarcinoma, rams, breeding soundness, semen