



HAL
open science

État des lieux des technologies innovantes pour le traitement antibiotique et antiviral de la semence

Lucile Guédon

► **To cite this version:**

Lucile Guédon. État des lieux des technologies innovantes pour le traitement antibiotique et antiviral de la semence. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04300619

HAL Id: dumas-04300619

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04300619v1>

Submitted on 22 Nov 2023

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

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

Copyright

Année 2023

**ÉTAT DES LIEUX DES TECHNOLOGIES INNOVANTES
POUR LE TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE ET ANTIVIRAL DE
LA SEMENCE**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE
présentée et soutenue publiquement devant
la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)
le 13 septembre 2023

par

Lucile, Mélanie, Élodie, GUÉDON

sous la direction de
Alline DE PAULA REIS

JURY

Présidente du jury :	Mme Sophie LE PODER	Professeure à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Alline DE PAULA REIS	Maître de Conférences à l'EnvA
Examinatrice :	Mme Anne-Claire LAGRÉE	Maître de Conférences à l'EnvA

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



Version juillet 2023

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicté	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Mathias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benckekroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Léila	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	François	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtinet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC

Remerciements

Au Professeur Sophie LE PODER, présidente du Jury de cette thèse,
pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de soutenance de ma thèse.
Remerciements respectueux.

Au Docteur Aline DE PAULA REIS, directrice de cette thèse,
pour m'avoir accordé sa confiance en m'attribuant ce sujet et pour m'avoir encadrée tout au long de ce travail, pour ses remarques toujours pertinentes, son implication et sa grande gentillesse.
Très sincères remerciements.

Au Docteur Anne-Claire LAGRÉE, examinatrice,
pour avoir accepté d'être examinatrice de mon jury de thèse.
Remerciements chaleureux.

À mes parents,
pour leur soutien sans faille dans tout ce que j'entreprends, leurs conseils avisés et tout l'amour qu'ils me donnent jour après jour.
Ces sept années de scolarité n'auraient pas été possibles sans leur grande implication et leur confiance en moi toujours solide.
Mille mercis.

À ma tante, mon parrain et tous les membres de ma famille,
pour m'avoir soutenue et chouchoutée depuis mon plus jeune âge.
Je vous embrasse.

À Albane, Séléna, Mathilde et Julie,
pour avoir été mes piliers durant toutes ces années d'école, dans les moments drôles comme dans le travail. Merci !

À toutes mes autres amies,
pour tous les bons moments partagés.

Table des matières

Liste des figures	5
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	11
Introduction.....	15
Première partie : marché mondial de la semence	17
Deuxième partie : méthode de préparation de la semence.....	19
1. Les standards de suivi sanitaire des taureaux en station	19
2. Le processus de préparation après la collecte.....	27
3. Méthodes d'évaluation de la qualité de la semence	29
A. <i>Analyse macroscopique</i>	30
a. Volume.....	30
b. Couleur	30
c. Viscosité.....	31
B. <i>Analyse microscopique</i>	31
a. Motilité massale	31
b. Motilité individuelle	32
c. Concentration en spermatozoïdes	32
d. Pourcentage de spermatozoïdes vivants.....	32
e. Morphologie des spermatozoïdes	33
f. Test d'aptitude à la congélation.....	33
C. <i>Analyse du sperme assistée par ordinateur (Computer Assisted Sperm Analysis : CASA)</i>	34
D. <i>Cytométrie de flux et marquages fluorescents</i>	35
a. Viabilité / mortalité	36
b. Intégrité de l'acrosome.....	36
c. Activité mitochondriale	37
d. Intégrité de l'ADN	37
e. Flux de calcium.....	38
4. Le traitement actuel des doses de semence : les antibiotiques utilisés et leurs limites	38
Troisième partie : agents pathogènes pouvant être transmis par la semence bovine	43
1. La rhinotrachéite infectieuse bovine	45
A. <i>Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non</i>	45
B. <i>Situation épidémiologique et distribution géographique</i>	45
C. <i>Diagnostic sérologique</i>	47
2. La diarrhée virale bovine	48
A. <i>Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non</i>	48
B. <i>Situation épidémiologique et distribution géographique</i>	49
C. <i>Diagnostic sérologique</i>	50
3. La fièvre catarrhale ovine	51
A. <i>Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non</i>	51
B. <i>Situation épidémiologique et distribution géographique</i>	51
C. <i>Diagnostic sérologique</i>	53
4. La leucose bovine enzootique	54
A. <i>Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non</i>	54
B. <i>Situation épidémiologique et distribution géographique</i>	55

C. Diagnostic sérologique.....	55
5. Le virus Schmallenberg	56
A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non	56
B. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	57
C. Diagnostic sérologique.....	58
6. La dermatose nodulaire contagieuse bovine	59
A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non	59
B. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	60
C. Diagnostic sérologique.....	61
7. La fièvre aphteuse	63
A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non	63
B. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	63
C. Diagnostic sérologique.....	65
8. La brucellose.....	67
A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non	67
B. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	68
C. Diagnostic sérologique.....	70
9. La tuberculose.....	71
A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non	71
B. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	72
C. Diagnostic sérologique.....	74
10. La Trichomonose	74
A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non	74
B. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	76
C. Diagnostic sérologique.....	76
11. Campylobactériose bovine génitale.....	76
A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non	76
B. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	77
C. Diagnostic sérologique.....	77
12. La fièvre Q.....	78
A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non	78
B. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	79
C. Diagnostic sérologique.....	80
13. La leptospirose	81
A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non	81
B. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	83
C. Diagnostic sérologique.....	83
14. La néosporose.....	84
A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non	84
B. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	85
C. Diagnostic sérologique.....	86

15. La paratuberculose	86
A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non	86
B. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	87
C. Diagnostic sérologique.....	89
16. Les infections à Chlamydiées	89
A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non	89
B. Situation épidémiologique et distribution géographique.....	92
C. Diagnostic sérologique.....	92
17. Autres bactéries : <i>Escherichia coli</i> vérotoxigène, <i>Histophilus somni</i> , <i>Ureaplasma diversum</i> , <i>Mycoplasma mycoides</i> ssp. <i>mycoides</i>	94
18. Synthèse sur les maladies dont l'agent se retrouve dans la semence	95
Quatrième partie : les techniques innovantes de traitement antibiotique et antiviral de la semence	97
1. Techniques innovantes de traitement antibiotique et antiviral de la semence	99
A. Adaptation des méthodes actuelles : procédures d'hygiène et nouvelles méthodes de dosages des antibiotiques.....	99
B. Sélection des individus avec une haute activité interne de destruction des bactéries (AIDB)	101
C. Centrifugation par gradient de densité et centrifugation en couche unique	102
D. Microfiltration.....	105
E. Les huiles essentielles	106
F. Les bactériocines.....	107
G. Nanoparticules : les nanotubes de carbone à paroi unique PEGylés et les nanoparticules d'argent	111
H. Les peptides antimicrobiens : les dérivés synthétiques de la magainine et les hexapeptides cycliques	112
a. Qu'est-ce-que les peptides antimicrobiens ?.....	112
b. Mode d'action	114
c. Efficacité	117
d. Effets sur la semence.....	121
e. Résistance bactérienne aux peptides antimicrobiens	127
I. La trypsine.....	128
J. Acidification transitoire	129
K. Inactivation photodynamique et photo-immuno-inactivation.....	130
a. Inactivation photo-dynamique.....	130
b. Photo-immuno-inactivation	133
2. Comparaison des techniques innovantes de traitement de la semence : tableau de synthèse	135
Cinquième partie : discussion générale	138
Conclusion	142
Liste des références bibliographiques	145

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes étapes de préparation de la semence, de la collecte à la mise en place (d'après Gerard et al., 2008).	29
Figure 2 : Prévalence de cheptels atteints d'IBR, par département, au 30 juin 2020 (données GDS France) (ANSES et al., 2021).	46
Figure 3 : Taux d'incidence de l'IBR dans les cheptels, par département, au 30 juin 2020 (données GDS France) (ANSES et al., 2021).	46
Figure 4 : Évolution du taux d'incidence national des cheptels atteints d'IBR entre 2016 et 2020 (données GDS France) (ANSES et al., 2021).	47
Figure 5 : Situation de la FCO en France métropolitaine au 17 avril 2018 (Ministère de l'Agriculture et Xicluna, 2022).	52
Figure 6 : Situation épidémiologique de la LBE dans le monde en janvier 2020 (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2020).	55
Figure 7 : Distribution du virus Schmallerberg par pays et par date de la première identification, par sérologie ou RT-qPCR (Collins et al., 2019).	58
Figure 8 : Diffusion spatiale de la dermatose nodulaire contagieuse bovine entre 2014 et 2017 en Turquie et dans les Balkans (ANDS (Animal Disease Notification System) et al., 2018).	60
Figure 9 : Distribution de la DNCB et des foyers de la maladie notifiés par les Services Vétérinaires nationaux à l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA) dans les pays d'Eurasie d'après les données de l'OMSA) et de l'EMPRES-i (Food and Agriculture Organisation – FAO) (Cauchard et al., 2020).	61
Figure 10 : Distribution mondiale des sérotypes du virus de la fièvre aphteuse entre Janvier 2012 et Janvier 2022 (Mclaws et Shankar, 2022).	64
Figure 11 : Carte du statut officiel des membres de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale vis-à-vis de la fièvre aphteuse (Organisation mondiale de la santé animale, 2022a).	64
Figure 12 : Répartition dans le monde de <i>Brucella abortus</i> entre 2020 et 2022 (Organisation mondiale de la santé animale, 2022b).	69
Figure 13 : Évolution des pourcentages de prévalence et d'incidence annuelles des élevages infectés de Tuberculose bovine en France de 1995 à 2020 (Plateforme ESA, 2021).	73
Figure 14 : Carte des foyers bovins déclarés infectés de tuberculose en 2020 (ANSES, 2021).	73
Figure 15 : Adhérences entre <i>Tritrichomonas foetus</i> et des spermatozoïdes, vues au microscopie électronique à balayage (Benchimol et al., 2008).	75
Figure 16 : Adhérence de <i>Coxiella burnetti</i> à la surface des spermatozoïdes, vue au microscope électronique (Kruszewska et Tylewska-Wierzbanowska, 1993, 1997).	79

Figure 17 : Situation de la Paratuberculose dans le monde au deuxième semestre 2010 (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021a).	88
Figure 18 : Liaison de <i>C. abortus</i> et <i>C. psittaci</i> aux spermatozoïdes de bovins, visualisée au microscope optique (grossissement : x 1000) (Eckert et al., 2019).	91
Figure 19 : Images de microscopie électronique à transmission montrant l'interaction <i>Chlamydia</i> - spermatozoïdes. (Eckert et al., 2019)	91
Figure 20 : Représentation de la structure de quelques lantibiotiques (Bali et al., 2016).	107
Figure 21 : Effet de la supplémentation à différentes concentrations d' ϵ -polylysine sur la concentration bactérienne totale et les paramètres de qualité du sperme de verrat conservé à 17 °C pendant 5 jours (Shaoyong et al., 2019).	109
Figure 22 : Structure d'un nanotube de carbone à monoparoi (Barreteau, 2021).	111
Figure 23 : Schémas de différents PAM, naturels ou synthétiques (adapté d'après Schulze et al., 2016).	113
Figure 24 : Mode d'action des PAM, exemples de la magainine et du cyclo-RRRWWF (c-WFW) (adapté d'après Schulze et al., 2016).	115
Figure 25 : Concentration bactérienne dans la semence traitée par de la gentamicine ou des PAM en fonction du temps (adapté d'après Speck et al., 2014).	118
Figure 26 : Concentration bactérienne dans la semence traitée par de la gentamicine ou des associations de gentamicine et de PAM en fonction du temps (adapté d'après Speck et al., 2014).	119
Figure 27 : Potentiel de neutralisation du LPS par différents peptides antimicrobiens et par la gentamicine (adapté d'après Schulze et al., 2015b).	121
Figure 28 : Paramètres de mobilité spermatique (motilité progressive (A) et pourcentage de spermatozoïdes non motiles (B)) après 5 minutes d'incubation des doses de semence avec des concentrations croissantes (5, 10, 20 et 40 μ M) de c-WFW, c-WWW et MK5E (Schulze et al., 2014)	122
Figure 29 : Paramètres de mobilité spermatique (amplitude de déplacement latéral (C), fréquence de battements croisés (D), linéarité de déplacement (E) et pourcentage de spermatozoïdes hypermotiles (F)) après 5 minutes d'incubation des doses de semence avec des concentrations croissantes (5, 10, 20 et 40 μ M) de c-WFW, c-WWW et MK5E (Schulze et al., 2014) (continuation).	123
Figures 30 : Motilité spermatique progressive après conservation à 16°C durant 12 ou 96 h (A) ou après un TRT de 30 ou 300 min (B) des doses de semence contenant des concentrations de 4 μ M et 8 μ M de c-WFW, 2 μ M et 4 μ M de c-WWW, et 1 μ M et 2 μ M de MK5E (Schulze et al., 2014).	124
Figure 31 : Vitesse moyenne sur la trajectoire des spermatozoïdes après conservation à 16°C durant 12 ou 96 h (C) ou après un TRT de 30 ou 300 min (D) des doses de semence contenant des concentrations de 4 μ M et 8 μ M de c-WFW, 2 μ M et 4 μ M de c-WWW, et 1 μ M et 2 μ M et 4 μ M de c-WWW, et 1 μ M et 2 μ M de MK5E (Schulze et al., 2014).	125

Figure 32 : Motilité spermatique linéaire après conservation à 16°C durant 12 ou 96 h (E) ou après un TRT de 30 ou 300 min (F) des doses de semence contenant des concentrations de 4 µM et 8 µM de c-WFW, 2 µM et 4 µM de c-WWW, et 1 µM et 2 µM de MK5E (Schulze et al., 2014).	126
Figure 33 : Infectiosité du VIH-1 après une brève exposition (1 min) à la trypsine concentrée à 0,25 %, mesurée par la production de l'antigène p24 (indicateur de la réplication du VIH-1) (Loskutoff et al., 2005).....	129
Figure 34 : Diagramme du niveau d'énergie et processus photophysique/photochimique impliqués dans l'inactivation photodynamique (adapté de Dabrowski et Arnaut, 2015 ; Malatesti et al., 2017 ; Teles et al., 2018).....	131
Figure 35 : Analyse comparative des titres viraux sous IPD en utilisant les porphyrines TPPS4, ZnTPPS4, TMPyP et ZnTMPyP, à des temps d'irradiation de 15, 30, 60 et 120 minutes (Teles et al., 2018).....	132
Figure 36 : Titrage viral en fonction du temps d'irradiation des PS sans base (HP et ZnPc), des photoimmunoconjugués (HP-IgY et ZnPc-IgY), et des témoins (Oliveira et al., 2020).....	133

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des critères exigés pour le suivi sanitaire des bovins mâles en centre d'insémination artificielle (d'après Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021a).	25
Tableau 2 : Classement du sperme en fonction des critères de l'examen macroscopique : recommandations de la société de Thériogénologie (d'après Elmore, 1985).	31
Tableau 3 : Exemples de traitements antibiotiques utilisés dans les doses de semence de taureaux, et verrats (Santos et Silva, 2020).	39
Tableau 4 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de l'IBR (d'après de Wit et al., 19981 ; Valas et al., 2019 ² ; Sarangi et al., 20213).	48
Tableau 5 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la BVD (Sandvik, 2005 ; Hanon et al., 2018 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018a).	50
Tableau 6 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la FCO (Afshar et al., 1989 ; Reddington et al., 1991 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021c).	54
Tableau 7 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la LBE (Miller et al., 1981 ; Mammerickx et al., 1984 ; Simard et al., 2000 ; Kale et Öztürk, 2004 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018b).	56
Tableau 8 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de l'infection par le virus Schmallenberg (van der Heijden et al., 2013 ; Lazutka et al., 2014 ; Wernike et al., 2017).	59
Tableau 9 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la DNCB (Milovanović et al., 2019; Samojlović et al., 2019).	62
Tableau 10 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la Fièvre aphteuse (Chénard et al., 2003 ; Gonzales et al., 2014 ; Morgan et al., 2014).	66
Tableau 11 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la Brucellose (Abernethy et al., 2012 ; Khurana et al., 2021).	71
Tableau 12 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la Fièvre Q (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010 ; Emery et al., 2014 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018d ; Lurier et al., 2021).	81
Tableau 13 : Utilisation préconisée par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale des tests de diagnostic sérologique de la Fièvre Q (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018b).	81
Tableau 14 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la Leptospirose (Otaka et al., 2012 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021f).	84
Tableau 15 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la Néosporose (Alvarez-García et al., 2013).	86
Tableau 16 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique des infections à Chlamydiées chez les bovins (Vlahović et al., 2001).	93

Tableau 17 : Résumé des principales caractéristiques des maladies dont les agents pathogènes sont présents dans la semence bovine, classées par ordre décroissant de transmissibilité par la semence.95

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AGID : Test d'immunodiffusion sur gel d'agar
AHAW : *Animal Health And Welfare*
AIDB : Activité Interne de Destruction des Bactéries
ALT : Amplitude Latérale de déplacement de la Tête des spermatozoïdes
ANDS : *Animal Disease Notification System*
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'environnement et du travail
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BLV : Virus Leucémogène Bovin
BoHV-1 : Herpesvirus bovin de type 1
BTS : *Beltsville Thawing Solution*
BTV : *Blue Tongue Virus*
BVD : Diarrhée virale bovine
BVDV : Virus de la Diarrhée virale bovine
CaPV : Capripoxvirus
CASA : *Computer Assisted Semen Analyser*
CCU : Centrifugation en Couche Unique
CE : Corps Élémentaire
CFU : Unité formant colonie
CGB : Campylobactériose Génitale Bovine
CGD : Centrifugation par Gradient de Densité
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CP : souche cytopathogène
CR : Corps Réticulé
c-WFW : peptide antimicrobien de structure cyclique composée de trois arginines, un tryptophane, une phénylalanine et un tryptophane
c-WWW : peptide antimicrobien de structure cyclique composée de trois arginines et trois tryptophanes
DNCB : Dermatose Nodulaire Contagieuse des Bovins
EAT : Épreuve à l'Antigène Tamponné
EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
ESA : Épidémiosurveillance Santé Animale
 ϵ -PL : ϵ -polylysine
FA : Fièvre Aphteuse
FBC : Fréquence de Battements Croisés
FC : Fixation du complément
FCO : Fièvre Catarrhale Ovine

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
FMDV : *Foot and Mouth Disease Virus*
GDS : Groupement de Défense Sanitaire
HACCP : *Hazard Analysis Critical Control Point*
HP : Hématoporphyrine
IA : Insémination Artificielle
IBR : Rhinotrachéite infectieuse bovine
IFI : Immunofluorescence Indirecte
Ig : Immunoglobuline
IPD : Inactivation photodynamique
IPI : Infecté Permanent Immunotolérant
JC-1 : Iodure de 5,5, 6,6'-tétrachloro-1,1',3,3' tétraéthylbenzimidazolylcarbocyanine
KO : *Knock-out*
LBE : Leucose Bovine Enzootique
LNCR : Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs
LPS : Lipopolysaccharides
LSA : Loi Santé Animale
MAP : *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
MAT : Test de microagglutination
MG2 : MK5E : Magainine 2
MST : Maladie Sexuellement Transmissible
NCP : souche non cytopathogène
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OMSA : Organisation Mondiale de la Santé Animale
PAC : Politique Agricole Commune
PAM : Peptide Antimicrobien
PBD-1 : β -défensine 1
PBD-2 : β -défensine 2
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PCV 2 : Circovirus porcin de type 2
PMAP : Peptide Myéloïde Antimicrobien Porcin
PNS : protéines non structurales
PR : Peptide antimicrobien riche en proline
PS : Photosensibilisateur
PSv : protéines structurales virales
PVP : polyvinylpyrrolidone
ROS : espèces réactives de l'oxygène
SAT : Test d'agglutination standard en tube
SBV : Virus Schmallenberg
SD : *Standard Deviation*
Spz : spermatozoïdes
TCID₅₀ : *50% Tissue Culture Infectious Dose*
TFC : Test de Fixation du Complément
TMPyP : methylpyridiniumyl

TNV : Test de Neutralisation Virale
TPPS4 : p-sulfonatofenyl
TPRB : Test sur Plaque au Rose Bengale
T-SS : Tachyplésine I
TRT : Test de Résistance Thermique
TUNEL : *Terminal transferase dUTP nick end labeling*
VDNC : Virus de la Dermatose Nodulaire Contagieuse des Bovins
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VMT : Vitesse Moyenne sur la Trajectoire
VPI : Vulvovaginite Pustuleuse Infectieuse
ZnPc : zinc-tétracarboxy-phtalocyanine
ZnTMPyP : zinc-méthylpyridiniumyl
ZnTPPS4 : zinc-p-sulfonatofenyl

Introduction

L'insémination artificielle est une technique largement répandue pour la gestion de la reproduction en élevage. À titre d'exemple, 13 % des vaches allaitantes et 79 % des vaches laitières sont inséminées artificiellement en France. De plus, 59 % de la totalité des élevages bovins ont recours à l'insémination artificielle, seule ou en complément de la monte naturelle (Bidan *et al.*, 2018). Cependant, sa large utilisation en fait une technique particulièrement à risque de diffusion de maladies au sein des cheptels.

Ainsi, en plus d'une réglementation stricte permettant de limiter les risques sanitaires, les traitements anti-infectieux de la semence ont une importance toute particulière, tant d'un point de vue économique que sanitaire. Si le traitement des infections bactériennes repose largement sur l'utilisation d'antibiotiques dans la semence, il n'y a pas de traitement antiviral utilisé. La maîtrise du risque de maladies virales repose donc exclusivement sur les tests de dépistage effectués chez les reproducteurs en station. Cela soulève cependant deux problèmes principaux.

Tout d'abord dans une démarche globale de réduction de l'utilisation des antibiotiques il convient de s'interroger sur l'existence éventuelle de méthodes alternatives pour détruire les agents pathogènes sensibles aux antibiotiques dans la semence.

Ensuite, les tests réalisés sur les reproducteurs en station ne sont pas parfaitement fiables et ne permettent pas d'exclure un risque de contamination de la semence et donc des doses utilisées pour les inséminations artificielles. En témoigne l'exemple de la réintroduction chez les bovins du virus de la Fièvre Catarrhale Ovine sérotype 8 entre 2015 et 2018, dont l'origine serait d'après l'hypothèse actuelle une réutilisation de semence contaminée et congelée lors de la 1^{ère} émergence en 2006 (Peroz et Ganière, 2021).

Afin de pallier à ces problèmes, des procédés innovants de traitement antibiotique et antiviral de la semence se développent.

Ainsi, l'objectif de ce travail bibliographique sera dans un premier temps de faire un rappel des mesures de suivi sanitaire des reproducteurs et des méthodes de traitement de la semence ainsi que de décrire les agents pathogènes transmissibles par la semence avant de faire un état des lieux des méthodes innovantes de traitement de la semence qui représentent ainsi une alternative aux méthodes de traitement existantes, en particulier à l'usage d'antibiotiques, mais qui permettent également d'élargir le spectre de traitement de la semence à d'autres groupes de pathogènes, et notamment aux virus. Nous en comparerons ensuite les caractéristiques telles que le spectre d'action, l'efficacité et l'impact sur la qualité de la semence.

Première partie : marché mondial de la semence

L'insémination artificielle (IA) est une technique apparue sur le marché de la reproduction animale il y a plus de 60 ans et qui s'est depuis largement démocratisée. Ainsi, le marché mondial de l'insémination artificielle animale, toutes espèces confondues, devrait dépasser les 2 milliards de dollars US en 2021 et afficher un taux de croissance annuel de 6,5 % (Future Market Insights, 2021).

L'IA est utilisée chez une grande variété d'espèces, qu'il s'agisse d'animaux d'élevage, domestiques, ou dans une moindre mesure, d'animaux sauvages. Son utilisation est particulièrement répandue dans les élevages d'animaux dont les produits sont destinés à l'alimentation et notamment chez les vaches laitières, suivies des truies et plus rarement des moutons et des chèvres. L'IA est également utilisée chez les équidés ainsi que chez des animaux domestiques (chiens, chats...).

Au niveau mondial, la plus large part des ventes de semence est détenue par le secteur bovin qui représentait à lui seul plus de 46 % du marché en 2020 (Kamdi *et al.*, 2021). Plus particulièrement, parmi les bovins, l'utilisation de l'IA est fortement répandue chez les bovins laitiers. À titre d'exemple, près de 80 % des vaches laitières sont inséminées artificiellement aux États-Unis et en France (Bidan *et al.*, 2018 ; Future Market Insights, 2021).

Plusieurs caractéristiques de l'IA permettent d'expliquer cette croissance continue depuis son avènement. Tout d'abord, l'insémination artificielle et les banques de sperme ont permis une large diffusion du progrès génétique au sein des cheptels en facilitant l'accès au matériel génétique d'un grand nombre de reproducteurs. Plus récemment, la possibilité de sexer la semence est de plus en plus recherchée, notamment en élevage bovin laitier, comme en témoigne l'augmentation de 13 % des ventes de semence sexée au niveau mondial entre 2019 et 2020 (Kamdi *et al.*, 2021). Cette capacité à sélectionner les reproducteurs pour fournir des descendants aux capacités de production optimales est un facteur d'autant plus favorable à l'utilisation de l'IA dans le contexte actuel de forte augmentation de la demande en protéines animales et ainsi de la recherche d'une productivité maximale par les éleveurs. Aussi, la commercialisation de la génétique sous forme de semence représente un large choix de ressources génétiques rapidement mobilisable permettant d'introduire rapidement de nouvelles caractéristiques dans un troupeau, selon les besoins d'une époque. Un exemple d'actualité est la recherche d'animaux plus robustes ou plus résistants à la chaleur.

De plus, les méthodes de conservation de la semence, sous forme fraîche réfrigérée ou congelée, et de stockage, rendent possible son transport et son envoi entre pays différents, ce qui contribue à accroître encore davantage la diversité génétique à laquelle les éleveurs ont accès grâce à l'IA.

Ensuite, l'insémination artificielle est généralement considérée comme plus hygiénique que la monte naturelle et a en effet permis de réduire la transmission de nombreuses maladies contagieuses et maladies sexuellement transmissibles (MST). En

effet, la présence d'antibiotiques dans les dilueurs contenus dans les doses de semence a contribué à limiter la transmission de maladies bactériennes par la semence. De plus, les tests de dépistage réalisés sur les reproducteurs en station et sur la semence ont permis une réduction du risque de transmission de maladies virales. Néanmoins, cette méthodologie est parfois insuffisante comme nous le développerons plus tard dans cette partie.

De plus, le contexte politique est souvent une aide au développement de l'IA. En effet, de nombreux pays ont choisi de soutenir son utilisation à l'aide de politiques incitatives telles que celle mise en place par la réforme agricole en Inde ou certaines dispositions de la Politique Agricole Commune (PAC) Européenne.

Par exemple, l'Inde a récemment lancé une série de mesures visant à réformer son agriculture dans le but d'une plus grande efficacité et accorde pour cela des fonds afin d'améliorer la productivité de l'élevage, ce qui passe par accroître l'utilisation de l'IA. C'est ainsi que l'Inde représente à présent 40 % du marché de la semence en Asie du Sud-Est (Future Market Insights, 2021).

En Europe, des dispositions intégrées à la PAC depuis la réglementation de 2006 à des fins de gestion du risque et d'amélioration de l'efficacité des systèmes de production et de santé animale contribuent à encourager l'utilisation de l'IA (Bielza Diaz-Caneja *et al.*, 2009).

Tout cela explique l'utilisation croissante de l'IA dans le monde, tant dans les pays développés que dans les pays en développement. Ainsi, en 2020, les pays où l'utilisation de l'IA présentait la plus forte croissance étaient le Brésil, l'Inde et la Chine tandis que dans certains pays comme les États-Unis, l'Allemagne ou l'Argentine par exemple, les niveaux d'utilisation étaient déjà très hauts (Future Market Insights, 2021; Kamdi *et al.*, 2021).

Néanmoins, comme identifié par les auteurs du rapport intitulé « *Animal Artificial Insemination Market : Global Sales Analysis and Opportunity* » (Future Market Insights, 2021), la principale limite au commerce de la semence est la qualité sanitaire de celle-ci, en particulier vis-à-vis des virus. Les auteurs développent en particulier l'exemple du virus de l'artérite virale dans la semence des étalons. Ce virus possède la capacité de demeurer dans la semence pendant plusieurs semaines avant d'induire une séroconversion (Future Market Insights, 2021). Cela rend alors inefficaces les tests sérologiques réalisés sur le sérum des reproducteurs en station afin de détecter d'éventuelles infections antérieures et représente un risque de contamination pour les femelles naïves.

Ainsi, le risque de transmission d'agents pathogènes, en particulier viraux, a été identifié comme une limite à la croissance du marché mondial de la semence au cours des prochaines années.

Dans ce contexte, le développement de méthodes permettant le traitement antiviral de la semence apparaît comme un enjeu majeur pour l'avenir du marché de l'insémination artificielle, et ce davantage encore dans le cadre d'échanges toujours plus mondialisés.

Deuxième partie : méthode de préparation de la semence

Afin de pouvoir être utilisée pour l'insémination artificielle la semence doit d'abord passer par de nombreuses étapes. Celles-ci vont de sa collecte à sa préparation pour sa conservation, en passant par son traitement. Ces étapes occupent de plus en plus une place très importante dans la maîtrise sanitaire de la semence. En effet, plusieurs d'entre elles représentent des points de contrôles importants de la qualité sanitaire des doses de semence. Tout d'abord les standards de suivi sanitaire des reproducteurs en station imposent des tests de dépistage sérologique et sur la semence, devant être réalisés à plusieurs moments avant et pendant leur séjour dans les établissements de collecte. Ces tests de dépistage permettent de rechercher plusieurs maladies transmissibles par voie vénérienne, telles que la Brucellose, la Tuberculose, la Diarrhée virale bovine ou encore la Rhinotrachéite infectieuse bovine par exemple, et ainsi d'en limiter la présence des agents pathogènes dans la semence, évitant ainsi leur diffusion au sein des cheptels. Ensuite, la préparation et le traitement de la semence, notamment par l'ajout d'antibiotiques, permettent encore de diminuer la contamination des doses de semence et ainsi d'en préserver leur qualité. De plus, les centres de collecte jouent un rôle important dans la biosécurité des doses de semence, non seulement de par les traitements appliqués à la semence mais aussi par le maintien d'exigences élevées en matière d'hygiène, lesquelles contribuent largement à la qualité sanitaire finale des doses de semence.

Enfin, c'est également à cette occasion que la qualité de la semence est évaluée à l'aide de différentes méthodes, allant de méthodes d'évaluation macroscopique à des méthodes sophistiquées telles que le système CASA (*Computer Assisted Semen Analyser*).

1. Les standards de suivi sanitaire des taureaux en station

La qualité sanitaire de la semence en paillettes utilisée pour les inséminations artificielles dépend en partie des conditions d'hygiène lors de sa préparation mais aussi pour une partie importante des standards de suivi sanitaire des reproducteurs en station. En effet, ceux-ci ont pour but de s'assurer que les animaux donneurs sont indemnes d'un certain nombre de maladies, afin de fournir une semence exempte de ces pathogènes et ainsi d'en éviter la diffusion dans les cheptels via l'insémination artificielle. Ce suivi est d'autant plus important pour les maladies virales contre lesquelles aucun traitement n'est actuellement mis en place sur les doses de semence.

Les maladies pour lesquelles un suivi sanitaire est impératif chez les reproducteurs en station sont listées au chapitre 4.7 du *Code sanitaire pour les animaux terrestres* de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale. Pour les taureaux en station de reproduction il s'agit des maladies suivantes :

- Brucellose
- Tuberculose bovine
- Diarrhée virale bovine
- Rhinotrachéite infectieuse bovine
- Fièvre catarrhale ovine
- Campylobactériose à *Campylobacter fetus* var. *venerealis*
- Tritrichomonose à *Tritrichomona foetus*

Ainsi, chacune de ces maladies fait l'objet d'examen de dépistage devant être réalisés antérieurement à l'entrée dans la zone d'isolement préalable à l'admission, dans la zone d'isolement préalable à l'admission ou lors de la période d'hébergement des animaux dans les installations de collecte de semence. Ces examens doivent être réalisés tant sur les taureaux donneurs que sur les animaux boute-en-train. Les tests de dépistage peuvent être réalisés directement sur la semence ou consister en des analyses sérologiques. La liste des tests nécessaires, ainsi que les méthodes pouvant être employées, sont définies par la législation et seront présentées dans la suite de ce travail.

Enfin, pour les doses de semences destinées à l'exportation, des tests supplémentaires peuvent être demandés selon le pays de destination.

Brucellose :

Tout d'abord, pour pouvoir être admis dans une station de quarantaine agréée puis en centre de collecte de la semence, les taureaux ou les animaux boute-en-train doivent préalablement avoir séjourné exclusivement, depuis leur naissance, dans un cheptel bovin de statut officiellement indemne de Brucellose bovine et être nés de mère appartenant à un cheptel officiellement indemne de Brucellose bovine.

Ensuite, avant leur admission dans les installations de collecte de semence du centre d'insémination artificielle, les taureaux, ainsi que les animaux boute-en-train, doivent être maintenus dans une zone d'isolement durant au moins 28 jours. Les animaux doivent y être soumis à des épreuves de diagnostic pour la Brucellose, au moins 21 jours après leur admission. Le diagnostic sérologique peut être effectué par épreuve à l'antigène tamponné (EAT) ou par épreuve de fixation du complément (FC) ou par épreuve immunoenzymatique (ELISA) sur sérum individuel. Le test sérologique réalisé doit fournir un résultat négatif pour que les animaux puissent accéder aux locaux du centre d'insémination.

La France étant officiellement indemne de Brucellose, les contrôles avant l'entrée en zone d'isolement, puis annuels lors de l'hébergement en centre d'insémination, ne sont pas nécessaires.

Tuberculose bovine :

De même que pour la Brucellose, pour pouvoir être admis dans une station de quarantaine agréée puis en centre de collecte de la semence, les taureaux ou les animaux boute-en-train doivent préalablement avoir séjourné exclusivement, depuis leur naissance, dans un cheptel bovin de statut officiellement indemne de Tuberculose bovine et être nés de mère appartenant à un cheptel officiellement indemne de Tuberculose bovine.

Ensuite, durant la période d'isolement de 28 jours en quarantaine, une intradermotuberculation doit être réalisée et son résultat négatif conditionne l'accès au centre de collecte de la semence.

Enfin, durant leur séjour en centre de collecte, tous les taureaux ou animaux boute-en-train hébergés devront satisfaire avec résultats favorables, au moins une fois par an, à une intradermotuberculation.

Diarrhée virale bovine :

Avant leur entrée en isolement les animaux doivent présenter un résultat négatif à une épreuve d'isolement du virus ou de recherche des antigènes viraux, et être soumis à une épreuve sérologique afin de déterminer le statut sérologique de chaque animal.

Une fois dans la zone d'isolement, et au moins 21 jours après l'admission, de nouveaux tests doivent être réalisés. Tout d'abord, les animaux doivent présenter un résultat négatif à une épreuve d'isolement du virus ou à un test de détection de l'antigène viral. Une fois ce résultat négatif obtenu, tous les animaux placés dans la zone d'isolement pourront être admis dans les installations de collecte de la semence.

De plus, un test sérologique, afin de confirmer ou d'infirmer la présence d'anticorps spécifiques, devra être réalisé. L'admission ou non des animaux dans les installations de collecte de semence dépend de la cinétique des anticorps. Ainsi, si aucune séroconversion n'est observée chez les animaux non réagissants lors des tests antérieurs à l'isolement, alors tous les animaux (réagissants et non réagissants) pourront être admis dans les installations de collecte de la semence. Au contraire, si une séroconversion est observée, alors les animaux non réagissants devront être maintenus dans la zone d'isolement jusqu'à ce qu'aucune séroconversion ne se manifeste dans le groupe et ce pendant une période de trois semaines. Les animaux réagissant en sérologie, mais ayant présenté un résultat négatif à une épreuve d'isolement du virus ou de recherche des antigènes viraux, pourront quant à eux être admis dans les installations de collecte de la semence.

Enfin, les animaux hébergés dans les centres de collecte et ayant fourni un résultat négatif aux tests sérologiques précédents, devront être soumis à un dépistage sérologique annuel afin de confirmer chez eux l'absence d'anticorps spécifiques. En cas de séroconversion, chaque dose de l'animal concerné collectée depuis la date du dernier examen négatif devra être éliminée ou soumise à une épreuve de recherche de la présence du virus et y fournir un résultat négatif.

Rhinotrachéite infectieuse bovine :

Pour pouvoir entrer dans la zone d'admission, les animaux doivent provenir d'un élevage ayant le statut indemne de Rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) ou présenter un résultat négatif à un test sérologique de recherche de l'IBR.

Une fois dans la zone d'isolement, les animaux doivent subir au moins 21 jours après leur admission un nouveau test sérologique de recherche d'IBR et fournir un résultat négatif. En cas de résultat positif chez un animal, l'ensemble des autres animaux présents dans la

zone d'isolement devront être maintenus en quarantaine et être soumis à un nouveau test sérologique au moins 21 jours après le retrait de l'animal positif et fournir un résultat négatif.

Lors de l'hébergement en centre d'insémination les animaux doivent être soumis à un test sérologique de recherche de l'IBR au maximum tous les 12 mois d'intervalle et y fournir un résultat négatif.

Fièvre catarrhale ovine :

Du fait des échanges commerciaux entre les pays et des différences dans leurs statuts concernant la Fièvre catarrhale ovine (FCO), de nombreux critères sanitaires doivent être respectés par les animaux présents dans les établissements de collecte de la semence afin d'éviter la diffusion de la FCO à de nouveaux territoires via le commerce de marchandises à risque, comme l'est la semence.

Afin de pouvoir accéder à la zone d'isolement du centre d'insémination, les animaux doivent fournir de nombreuses garanties concernant leur statut vis-à-vis de la Fièvre catarrhale ovine. Ainsi, un certificat vétérinaire international doit attester que les animaux ne présentaient aucun signe clinique de fièvre catarrhale ovine le jour de leur chargement et qu'ils remplissaient une des conditions suivantes :

- les animaux ont été protégés contre les piqûres de culicoïdes, dans une exploitation protégée des vecteurs de la maladie, au moins pendant les 60 jours ayant précédé leur chargement, ainsi que pendant la durée de leur transport jusqu'au lieu de chargement, ou
- les animaux ont été protégés contre les piqûres de culicoïdes dans une exploitation protégée des vecteurs de la maladie, au moins pendant les 28 jours ayant précédé leur chargement, ainsi que pendant la durée de leur transport jusqu'au lieu de chargement. Ils doivent de plus présenter un résultat négatif à un test sérologique de recherche d'anticorps dirigés contre le groupe des virus de la FCO et réalisé 28 jours au moins après leur introduction dans l'exploitation mentionnée ci-dessus, ou
- les animaux ont été protégés contre les piqûres de culicoïdes dans une exploitation protégée des vecteurs de la maladie, au moins pendant les 14 jours ayant précédé leur chargement, ainsi que pendant la durée de leur transport jusqu'au lieu de chargement. Ils doivent de plus présenter un résultat négatif à un test sérologique de recherche d'anticorps dirigés contre le groupe des virus de la FCO et réalisé 14 jours au moins après leur introduction dans l'exploitation mentionnée ci-dessus, ou
- les animaux ont été vaccinés, au moins 60 jours avant leur chargement, contre tous les sérotypes dont la présence dans la population d'origine a été démontrée au moyen d'un programme de surveillance (sérotypes 4 et 8 en France continentale) et ont été identifiés comme tels, ou
- les animaux possédaient de façon prouvée, au moins pendant les 60 jours ayant précédé leur chargement, des anticorps dirigés contre tous les sérotypes du virus de la fièvre catarrhale ovine dont la présence dans la population d'origine a été démontrée au moyen d'un programme de surveillance (sérotypes 4 et 8 en France continentale).

Durant la période passée en zone d'isolement les animaux doivent répondre aux mêmes critères que précédemment.

Enfin, durant la période d'hébergement dans les installations de collecte de la semence, les mâles donneurs doivent disposer d'un certificat vétérinaire international attestant qu'ils ne présentaient aucun signe clinique de fièvre catarrhale ovine le jour de la collecte de la semence et qu'ils répondaient à un des critères ci-dessous :

- les mâles donneurs ont été maintenus au moins pendant les 60 jours ayant précédé le début des opérations de collecte de semence, ainsi que pendant le déroulement de celles-ci, dans une exploitation protégée des vecteurs de la maladie, ou
- ils ont présenté un résultat négatif à un test sérologique de recherche des anticorps dirigés contre le groupe de virus de la FCO et réalisé entre 28 et 60 jours après chaque collecte de semence pour l'expédition concernée, ou
- ils ont obtenu un résultat négatif à un test d'isolement viral ou d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), réalisées sur des échantillons de sang prélevés au début et à la fin de la période de collecte de la semence, et au moins tous les 7 jours (s'il s'agit d'épreuves d'isolement viral) ou au moins tous les 28 jours (s'il s'agit d'épreuves PCR) pendant la période de collecte de la semence pour l'expédition considérée.

Campylobactériose à *Campylobacter fetus* var. *venerealis* :

Lorsque les animaux sont en zone d'isolement, ils devront fournir un ou plusieurs résultats négatifs à un test de recherche de l'agent pathogène par mise en culture d'un prélèvement préputial. Ainsi, si l'animal est âgé de moins de 6 mois ou qu'il vit depuis cet âge dans un groupe composé exclusivement d'individus du même sexe, alors un résultat négatif à un seul test sera suffisant. En revanche, pour les animaux ne répondant pas à ces critères, trois résultats négatifs à des tests réalisés à des intervalles d'une semaine seront nécessaires. Ces tests peuvent être réalisés dès une semaine après l'admission des animaux dans la zone d'isolement.

Un frottis préputial doit être réalisé annuellement chez les animaux hébergés dans les centres de collecte. Celui-ci devra être analysé afin de s'assurer de l'absence de *Campylobacter fetus* var. *venerealis*. Les taureaux sélectionnés pour une nouvelle série de collecte de semence après une interruption de plus de six mois doivent être soumis à une épreuve de diagnostic pratiquée dans les 30 jours au plus avant la reprise de la collecte.

Tritrichomonose à *Tritrichomonas foetus* :

Lorsque les animaux sont dans la zone d'isolement avant leur admission dans les locaux de collecte de la semence, ils doivent fournir un ou plusieurs résultats négatifs à un test de recherche de l'agent pathogène réalisé par examen microscopique direct sur frottis préputial et par mise en culture d'un prélèvement préputial. Ainsi, si l'animal est âgé de moins de 6 mois ou qu'il vit depuis cet âge dans un groupe composé exclusivement d'individus du même sexe, alors un résultat négatif à un seul test sera suffisant. En revanche, pour les animaux ne répondant pas à ces critères, trois résultats négatifs à des tests réalisés à des intervalles d'une semaine seront nécessaires. Ces tests peuvent être réalisés dès une semaine après l'admission des animaux dans la zone d'isolement.

Un frottis préputial doit être réalisé annuellement chez les animaux hébergés dans les centres de collecte. Celui-ci devra être analysé afin de s'assurer de l'absence de *Tritrichomonas foetus*. Les taureaux sélectionnés pour une nouvelle série de collecte de semence après une interruption de plus de six mois doivent être soumis à une épreuve de diagnostic pratiquée dans les 30 jours au plus avant la reprise de la collecte.

L'ensemble des critères que les animaux en établissement de collecte de la semence doivent vérifier au cours de leur suivi sanitaire sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Résumé des critères exigés pour le suivi sanitaire des bovins mâles en centre d'insémination artificielle (d'après Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021a).

	Avant entrée dans la zone d'isolement	Durant la période d'isolement	Durant l'hébergement en centre d'insémination
Brucellose	Animal originaire d'un cheptel officiellement indemne et mère provenant d'un cheptel officiellement indemne	Test sérologique - *	-
Tuberculose	Animal originaire d'un cheptel officiellement indemne et mère provenant d'un cheptel officiellement indemne	Intradermotuberculination -	Intradermotuberculination - une fois par an
Diarrhée virale bovine	Isolement viral (sur sang, sperme ou fèces) - ou recherche d'antigènes viraux sur sang - Test sérologique -	Isolement viral (sur sang, sperme ou fèces) - ou recherche d'antigènes viraux sur sang - Test sérologique - *, selon cinétique des anticorps : - Animaux séro - à l'admission et en isolement → admission de tous les animaux du lot - Animaux séro - à l'admission et séro + en isolement → admission des animaux séro + dès l'admission, isolement des autres jusqu'à absence de séroconversion pendant 3 semaines	Test sérologique annuel - chez les animaux séro - à l'admission
Rhinotrachéite infectieuse bovine	Elevage d'origine indemne d'IBR ou Test sérologique -	Test sérologique - *	Test sérologique - (annuel)

Légende :

Test - : test négatif ; séro - : animaux présentant un test sérologique négatif

* : réalisé 21 jours ou plus après l'admission

** : possible dès 7 jours après l'admission

Tableau 1 : Résumé des critères exigés pour le suivi sanitaire des bovins mâles en centre d'insémination artificielle (d'après Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021a) (continuation).

	Avant entrée dans la zone d'isolement	Durant la période d'isolement	Durant l'hébergement en centre d'insémination
Fièvre catarrhale ovine	<ul style="list-style-type: none"> - Aucun signe de FCO le jour du chargement ET : - Protection contre les culicoïdes 60 jours ou plus avant transport, dans une exploitation protégée des vecteurs, ou - Protection contre les culicoïdes 28 jours ou plus avant transport, dans une exploitation protégée des vecteurs + test sérologique - 28 jours ou plus après introduction dans l'exploitation, ou - Protection contre les culicoïdes 14 jours ou plus avant transport, dans une exploitation protégée des vecteurs + test sérologique - 14 jours ou plus après introduction dans l'exploitation, ou - Vaccination 60 jours ou plus avant le transport + identification correspondante, ou - Sérologie positive 60 jours ou plus avant le transport. 		<ul style="list-style-type: none"> - Aucun signe de FCO le jour de la collecte ET : - Protections contre les vecteurs de la maladie pendant au moins 60 jours avant le début de la collecte, ou - Séro - entre 28 et 60 jours après chaque collecte, ou - Isolement viral sur sang - au moins tous les 7 jours ou PCR sur sang - au moins tous les 28 jours ; et au début et à la fin de chaque collecte.
Infection à <i>Campylobacter fetus var. venerealis</i>	-	1 ou 3 recherche(s) directe(s) du pathogène sur frottis préputial - **	Absence de pathogène au frottis préputial (annuel)
Infection à <i>Tritrichomonas foetus</i>	-	1 ou 3 recherche(s) directe(s) du pathogène sur frottis préputial - **	Absence de pathogène au frottis préputial (annuel)

Légende :

Test - : test négatif ; séro - : animaux présentant un test sérologique négatif

* : réalisé 21 jours ou plus après l'admission

** : possible dès 7 jours après l'admission

2. Le processus de préparation après la collecte

Une fois collectée, la semence va subir plusieurs étapes de préparation afin d'en assurer la conservation, la fertilité et la qualité sanitaire. Tout au long de ces étapes, le maintien de conditions d'hygiène satisfaisantes est particulièrement important et permettra de réduire considérablement la probabilité de contamination de la semence par une population bactérienne banale potentiellement pathogène.

Pour commencer, une fois prélevée, la semence est transmise au laboratoire du centre de collecte où la première étape consiste en une quantification de l'éjaculat en mesurant le volume par lecture directe dans le tube de collecte gradué ou par pesée.

Ensuite, la concentration en spermatozoïdes est déterminée par spectrophotométrie tandis que le pourcentage de gamètes mobiles et le type de motilité sont évalués par microscopie optique. Ces étapes permettent de s'assurer que les spermatozoïdes sont en quantité et en qualité suffisantes pour répondre à l'objectif d'un minimum de 8 millions de spermatozoïdes mobiles par paillette après décongélation (Gerard *et al.*, 2008).

L'étape suivante est la dilution. Elle correspond à l'ajout dans la semence de diluant, un milieu salin contenant du glycérol qui est un cryoprotecteur, ainsi que des tampons. Du jaune d'œuf ou du lait peuvent également être ajoutés à la semence mais ceux-ci ne doivent alors pas contenir d'agent pathogène ou doivent être stérilisés. Enfin, l'ajout d'anti-oxydant augmente *in vitro* les paramètres de vitesse des spermatozoïdes et pour certains taureaux améliore également la fertilité *in vivo*.

C'est également à cette étape que des antibiotiques sont ajoutés à la semence. Ainsi, chaque millilitre de semence doit contenir un mélange d'antibiotique à l'activité bactéricide au moins équivalente à celle des mélanges suivants : soit gentamicine (250 µg), tylosine (50 µg), lincomycine – spectinomycine (150/300 µg) ; soit pénicilline (500 UI), streptomycine (500 µg), lincomycine – spectinomycine (150/300 µg) ; soit amikacine (75 µg), divécacine (25 µg) (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021a). Les noms des antibiotiques ajoutés ainsi que leur concentration devront être mentionnés dans le certificat vétérinaire international.

Une fois diluée la semence est réfrigérée à 4°C.

La semence entame ensuite la phase d'équilibration qui correspond à la période séparant l'addition de glycérol de la congélation.

La semence est ensuite conditionnée en paillettes. Avant d'être remplies, les paillettes font l'objet d'une identification par un code à barres de dix caractères. De nombreuses informations y sont regroupées, en particulier concernant l'identification des taureaux. Ainsi, cette identification des doses permet leur traçabilité depuis la collecte, durant le processus du traitement puis jusqu'à la mise en place.

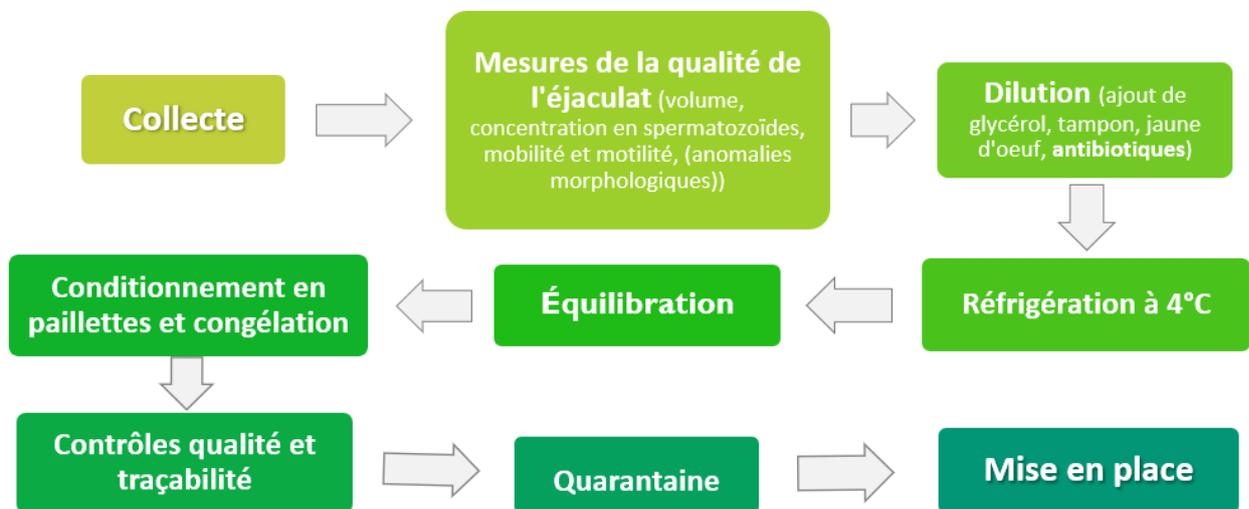
Les paillettes, d'un volume de 0,25 mL, sont ensuite congelées, directement dans les vapeurs d'azote ou à l'aide d'un congélateur programmable.

La dernière étape dans la prise en charge de la semence porte sur les contrôles de qualité et la traçabilité. Ainsi, chaque éjaculat fait l'objet d'un contrôle de qualité qui est effectué sur deux paillettes prises au hasard. Une fois décongelées dans de l'eau à 37°C pendant 30 secondes, le pourcentage et le nombre de spermatozoïdes vivants ainsi que leur motilité sont estimés en microscopie ou à l'aide d'un système CASA (Gerard *et al.*, 2008).

Enfin, avant d'être disponible pour l'insémination, les doses subissent une quarantaine d'une durée de trente jours afin de s'assurer que le taureau donneur n'était pas en période d'incubation d'une maladie contagieuse lors de la collecte.

Les différentes étapes de préparation de la semence sont reprises synthétiquement sur la figure suivante.

Figure 1 : Les différentes étapes de préparation de la semence, de la collecte à la mise en place (d'après Gerard et al., 2008).



3. Méthodes d'évaluation de la qualité de la semence

Une étape importante lors de la préparation de la semence est l'évaluation de sa qualité. Cette évaluation a pour but de s'assurer que la qualité de la semence est suffisante et ainsi qu'elle permettra un taux de fertilité satisfaisant suite à son utilisation pour l'IA. Celle-ci a lieu à deux moments au cours du processus de préparation : une première série d'analyses est réalisée sur les éjaculats juste après leur collecte et une deuxième série est réalisée à la fin du processus de conditionnement (Cabannes, 2008 ; Vincent *et al.*, 2014).

Les analyses réalisées sur les éjaculats immédiatement après leur collecte se déroulent en deux temps. Premièrement une analyse macroscopique est effectuée au cours de laquelle le volume, la couleur et la viscosité du sperme sont analysés. Deuxièmement, une analyse microscopique a lieu afin d'évaluer les motilités massale et individuelle, la concentration en spermatozoïdes, le pourcentage de spermatozoïdes vivants, la morphologie des spermatozoïdes. L'ensemble des analyses réalisées lors de ces deux temps ont pour but de déterminer si la qualité d'un éjaculat est suffisante pour permettre sa congélation ainsi que de déterminer la quantité de diluant à ajouter pour répondre à l'objectif d'un minimum de 8 millions de spermatozoïdes fléchants (c'est-à-dire des spermatozoïdes se déplaçant par une trajectoire linéaire) par paillette après décongélation (Cabannes, 2008).

Ensuite, afin de permettre une fertilité acceptable après IA, les spermatozoïdes contenus dans les paillettes de semence diluée et congelée doivent répondre à un certain nombre de critères. Ainsi, ils doivent être en nombre suffisant dans chaque paillette et posséder plusieurs caractéristiques essentielles pour permettre la fécondation : les spermatozoïdes doivent tout d'abord, bien entendu, avoir survécu à la procédure de congélation et décongélation, ils doivent de plus avoir conservé une morphologie normale,

un acrosome intact (l'acrosome est la partie antérieure du spermatozoïde qui, lors de sa fusion avec la membrane plasmique du spermatozoïde, libère les enzymes permettant la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule lors de la fécondation.), un ADN intègre, des mitochondries actives et enfin avoir conservé une motilité fléchante leur permettant de progresser dans le tractus génital femelle. Ainsi, plusieurs de ces critères sont évalués par les centres de préparation de la semence au cours de la deuxième série d'analyses qui a lieu avant la distribution des paillettes. Dans les centres de préparation de la semence, l'utilisation en routine de méthodes manuelles consistant à utiliser un microscope optique a longtemps été la norme, néanmoins, la subjectivité inter- et intra-technicien qu'elles engendraient a conduit à leur remplacement par des méthodes multiparamétriques. Ces dernières reposent sur l'utilisation du système CASA ou de la cytométrie de flux, ces méthodes permettant une approche plus rigoureuse, plus précise et nécessitant moins de temps que les méthodes manuelles, leur utilisation est maintenant largement répandue. Le système CASA permet ainsi d'analyser la motilité des spermatozoïdes tandis que la cytométrie de flux permet d'évaluer des paramètres tels que la viabilité des spermatozoïdes, l'activité mitochondriale, l'intégrité acrosomale ou de l'ADN et de déterminer le statut de capacitation (la capacitation spermatique est l'ensemble des changements physiologiques que connaît un spermatozoïde qui lui permettent d'acquérir la capacité de féconder un ovule) (Vincent *et al.*, 2014).

Ainsi, l'apport de ces méthodes d'évaluation de la qualité de la semence est important à deux titres : tout d'abord leur utilisation en routine dans les centres de préparation des doses de semence permet d'assurer la meilleure fertilité possible après IA, et deuxièmement dans les études scientifiques afin d'évaluer les effets des différents traitements appliqués à la semence sur celle-ci.

A. Analyse macroscopique

Immédiatement après la récolte un examen visuel du sperme est réalisé directement dans le tube de récolte et permet d'apprécier le volume, la couleur et la viscosité de l'éjaculat (Cabannes, 2008)

a. Volume

Le volume est mesuré le plus souvent par lecture directe du tube de collecte. Le volume varie entre les valeurs extrêmes de 0,5 à 14 ml avec une moyenne de 4 ml (Parez et Duplan, 1987).

b. Couleur

La couleur habituelle de la semence de taureau est blanchâtre, bien qu'une ration riche en carotènes puisse induire une discrète coloration jaunâtre. Une coloration jaunâtre prononcée, rosée ou brunâtre signe une anomalie. Tout échantillon avec une coloration anormale sera alors éliminé et une exploration devra être envisagée afin de caractériser l'origine de cette anomalie.

c. Viscosité

Enfin, le dernier paramètre faisant l'objet d'une analyse macroscopique est la viscosité de la semence. Celle-ci est corrélée positivement à la concentration en spermatozoïdes, ainsi plus un éjaculat contient de spermatozoïdes plus la semence sera visqueuse. Le sperme a généralement une consistance « laiteuse » à « crémeuse ». La présence de grumeaux dans l'échantillon ou la formation d'un filament glaireux à l'extrémité de la pipette signe une pathologie (Parez et Duplan, 1987). On peut également évaluer l'opacité du sperme qui est liée la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat.

Une fois l'ensemble des mesures macroscopiques réalisées, un classement du sperme est réalisé et permet d'en déterminer la qualité par comparaison aux recommandations de la société de Thériogénologie (Elmore, 1985) présentées dans le Tableau 2 :

Tableau 2 : Classement du sperme en fonction des critères de l'examen macroscopique : recommandations de la société de Thériogénologie (d'après Elmore, 1985).

Couleur	Turbidité	Consistance et viscosité	Concentration prévue en spermatozoïdes par ml	Qualité attribuée au sperme
Blanc	Opaque	Crémeuse et visqueuse	750 millions à 2 milliards	Très bonne
Blanc	Opaque	Faiblement visqueuse	400 à 750 millions	Bonne
Blanc sale	Légèrement translucide	Laitieuse	250 à 400 millions	Assez bonne à moyenne
Grisâtre	Translucide	Aqueuse	Inférieure à 200 millions	Mauvaise

B. Analyse microscopique

Après l'étape d'analyse macroscopique vient celle de l'analyse microscopique. À cette étape, les éjaculats n'ont toujours pas subi de traitement de conservation, ainsi, le matériel utilisé doit être à une température de 37°C afin de limiter la mortalité des spermatozoïdes (Cabannes, 2008).

a. Motilité massale

Le premier paramètre évalué est celui de la motilité massale. Il permet d'analyser la motilité d'un échantillon pris dans sa globalité. La motilité massale est estimée au microscope à contraste de phase au grossissement 100. Une microgoutte de sperme est déposée sur une lame et le mouvement global des spermatozoïdes est apprécié en fonction de l'intensité des vagues observables. Une note de 0 à 5 (0 = aucun mouvement décelable, 1 = léger mouvement, 2 = mouvement net mais ne formant pas de vague, 3 = début de vagues, 4 =

vagues très nettes, 5 = tourbillons rapides) est attribuée à l'échantillon observé. Lors de cet examen, on ne note pas la motilité individuelle des spermatozoïdes mais les turbulences engendrées par la conjugaison des mouvements issus de tous les spermatozoïdes présents dans la goutte de semence observée. Cela permet d'obtenir une première estimation du pourcentage de spermatozoïdes motiles. Les éjaculats de qualité satisfaisante présentent une note supérieure ou égale à 3.

b. Motilité individuelle

En complément de la motilité massale, la motilité individuelle est également évaluée. Elle consiste à diluer le sperme 10 à 40 fois dans un tampon isotonique tiède et à observer à fort grossissement (x 200) une goutte de cette solution au microscope à contraste de phase. Les spermatozoïdes possédant une motilité fléchante, c'est-à-dire présentant une trajectoire quasi rectiligne et capables de traverser le champ en deux à trois secondes, sont ensuite dénombrés.

Selon les laboratoires, cette analyse est réalisée en routine ou réservée aux cas où la motilité massale est insatisfaisante.

c. Concentration en spermatozoïdes

Afin d'estimer la concentration en spermatozoïdes, la méthode la plus souvent utilisée en routine est la néphélométrie (Dumont, 1997). Cette méthode consiste à mesurer l'absorption d'un flux lumineux à travers la semence diluée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 535 nm. Le rapport de la densité optique finale sur la densité optique émise est alors corrélé à la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat.

La détermination de la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat permet de calculer le taux de dilution adapté pour la réalisation de paillettes de semence congelée utilisées pour l'insémination artificielle. Le volume de dilueur à ajouter est calculé en tenant compte du nombre total de spermatozoïdes, du nombre de spermatozoïdes souhaités dans chaque dose et du volume utile de la paillette.

Enfin, la concentration de l'éjaculat doit être supérieure à 0,5 milliard par millilitre pour être conservé. Ainsi, plus de 20 % de la semence est éliminée car ne répondant pas aux critères de qualité (Cabannes, 2008).

d. Pourcentage de spermatozoïdes vivants

L'estimation du pourcentage de spermatozoïdes vivants est réalisée de manière approximative par observation au microscope optique et repose en grande partie sur l'appréciation de la qualité du mouvement.

L'examen peut également être réalisé sur un frottis coloré à l'éosine-nigrosine, l'éosine pénètre dans les spermatozoïdes dont la membrane plasmique est endommagée et apparaissent donc roses sur fond bleu (nigrosine) alors que les spermatozoïdes vivants ont une membrane intacte et apparaissent donc incolores.

Néanmoins, cette méthode est subjective et dépend fortement de l'opérateur (Cabannes, 2008).

Enfin, si le taux de spermatozoïdes vivants est inférieur à 60%, la semence n'est pas conservée.

Toutefois, cette analyse n'est que rarement utilisée dans les centres de préparation de la semence bovine car le critère de qualité le plus pertinent pour l'utilisation de la semence en IA bovine est le pourcentage de spermatozoïdes vivants après décongélation.

e. Morphologie des spermatozoïdes

L'examen de la morphologie des spermatozoïdes n'est pas systématiquement réalisé en routine. Certains laboratoires ne le réalisent pas du tout tandis que d'autres le réservent aux taureaux considérés comme « douteux » afin d'aider à la décision quant au devenir de leur semence. L'examen de la morphologie des spermatozoïdes est toutefois effectué sur les jeunes taureaux, avant la phase de testage, pour évaluer la fonction sexuelle du futur taureau reproducteur. Il est ensuite également réalisé chez les taureaux sélectionnés dans la filière de l'insémination artificielle. En France, c'est le Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs (LNCR) qui procède à au moins un examen morphologique de la semence par an.

L'examen morphologique des spermatozoïdes consiste en l'observation au microscope optique d'un frottis de semence coloré à l'éosine-nigrosine, au Giemsa, à l'encre de Chine ou au rose Bengale. Le frottis est alors observé au microscope à contraste de phase ou sous immersion et les anomalies sont dénombrées sur au moins 200 spermatozoïdes.

Le résultat de cet examen permet de distinguer différentes anomalies qui peuvent ensuite être classées par type. Trois classifications des anomalies de la morphologie spermatique existent. La classification adoptée par le Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs est celle basée sur la localisation de l'anomalie sur le spermatozoïde (anomalie de tête, de pièce intermédiaire, de flagelle).

Pour l'insémination artificielle, le sperme destiné à la congélation doit contenir moins de 20 à 25% de spermatozoïdes anormaux (Cabannes, 2008).

f. Test d'aptitude à la congélation

La dernière analyse microscopique réalisée est le test d'aptitude à la congélation. Ce dernier est effectué à la fin du processus de préparation des doses de semence. Il est réalisé pour chaque éjaculat sur 2 à 3 paillettes après congélation à - 196°C puis décongélation. Les changements de température imposés lors de la congélation et de la décongélation étant responsables de dommages aux spermatozoïdes, l'objectif de ce test est donc de s'assurer que l'altération fonctionnelle des spermatozoïdes a été suffisamment limitée au cours de la congélation afin de permettre un taux de fécondation satisfaisant après IA.

Ce test consiste à évaluer, dans les échantillons de semence décongelée, la motilité massale et individuelle et le pourcentage de spermatozoïdes morts et vivants, avec les mêmes méthodes que celles employées pour l'examen de la semence fraîche.

Bien que l'aptitude à la congélation soit généralement fortement corrélée de manière positive à la qualité du sperme frais (Dumont, 1997), il arrive parfois cependant qu'une semence jugée de bonne qualité, en frais, (note attribuée en motilité massale supérieure à 3 et plus de 60% de spermatozoïdes vivants) s'avère de mauvaise qualité après décongélation. Cela explique donc la nécessité de réaliser le test d'aptitude à la décongélation.

Enfin, pour qu'un éjaculat soit conservé, il doit présenter plus de 25% de spermatozoïdes fléchants avant congélation et plus de 8 millions de spermatozoïdes fléchants par paillette, après décongélation.

Les méthodes macroscopiques et microscopiques d'analyse de la qualité de la semence décrites ci-dessus présentent toutefois une limite majeure : leur subjectivité. On observe ainsi une variabilité dans les résultats intra et inter-laboratoires mais aussi intra et inter-opérateurs. Cela cause donc un manque de répétabilité de ces méthodes. De plus, cette variabilité dans l'évaluation des paramètres sémiologiques peut avoir des répercussions sur la décision d'utilisation ou de rejet de l'éjaculat et dans le cadre des échanges commerciaux.

Il apparaît donc nécessaire d'avoir recours à des méthodes présentant une plus forte reproductibilité afin de permettre une standardisation de l'évaluation de la qualité de la semence.

À ce titre, le système CASA et la cytométrie de flux présentent un avantage indéniable (par exemple, pour la variabilité des mesures intra-opérateur, le coefficient de variation est de 0,43 pour les méthodes conventionnelles contre 0,08 pour l'analyse assistée par ordinateur (Marnet *et al.*, 2000)).

Enfin, ces techniques présentent également l'avantage de permettre une évaluation plus précise de la qualité de la semence.

C. Analyse du sperme assistée par ordinateur (Computer Assisted Sperm Analysis : CASA)

Le système CASA est un outil puissant pour l'évaluation objective de la motilité des spermatozoïdes qui est désormais fréquemment utilisé pour évaluer la qualité de la semence. Le fonctionnement de cette technologie repose sur trois composants : un microscope permettant de visualiser l'échantillon, une caméra numérique pour capturer les images et un ordinateur avec un logiciel permettant l'analyse de celles-ci. Le principe de l'analyse repose sur la prise d'images des spermatozoïdes mobiles puis le traitement de celles-ci par le logiciel qui identifie chaque spermatozoïde de façon individuelle et en analyse sa trajectoire. Ainsi, l'utilisation de l'analyse assistée par ordinateur permet d'évaluer de nombreux paramètres de la mobilité spermatique et de décrire les mouvements

spécifiques des spermatozoïdes avec une plus grande précision qu'avec les méthodes d'évaluation subjective.

Les paramètres fréquemment collectés avec le système CASA sont : la motilité, la vitesse, la linéarité de la trajectoire et le déplacement latéral des spermatozoïdes. Parmi ceux-ci, les pourcentages de motilité totale et progressive sont les paramètres les plus importants de l'analyse de la motilité des spermatozoïdes.

Outre l'évaluation de la motilité des spermatozoïdes, le logiciel peut calculer les valeurs cinétiques de chaque spermatozoïde, ce qui comprend la vitesse de déplacement, la largeur de la trajectoire de la tête du spermatozoïde et la fréquence de changement de direction de la tête du spermatozoïde. Les valeurs de vitesse qui sont déterminées par CASA sont la vitesse curviligne, la vitesse en ligne droite et la vitesse moyenne de la trajectoire. L'amplitude du déplacement latéral de la tête et la fréquence des battements croisés sont deux autres caractéristiques mesurées par les instruments CASA.

Enfin, en plus des informations concernant la motilité des spermatozoïdes, le système CASA peut également fournir des informations sur la concentration en spermatozoïdes de la semence, la morphologie des spermatozoïdes, leur viabilité et la fragmentation de leur ADN. Ces techniques plus spécialisées ne sont toutefois pas utilisées en routine dans les centres de préparation de la semence (Vincent *et al.*, 2014).

Un atout supplémentaire du système CASA est la corrélation entre les paramètres mesurés et la fertilité de la semence analysée. En effet, plusieurs groupes d'études ont démontré une corrélation significative entre la motilité totale et progressive de la semence de taureau et sa fertilité (Vincent *et al.*, 2014). De plus, en comparaison des méthodes d'analyse subjective, les études ont démontré le haut potentiel du système CASA pour évaluer la qualité de la semence et en prédire sa fertilité, cela en particulier grâce à l'approche multiparamétrique de cette technique (Vincent *et al.*, 2014).

Cependant, afin d'arriver à ce résultat, une standardisation des conditions d'analyse est nécessaire pour obtenir une corrélation valable entre les paramètres mesurés et la fertilité. En effet, de nombreux éléments (comme par exemple la concentration de la semence, le type de diluant utilisé ou encore la température durant l'analyse) sont susceptibles d'induire un biais lors de l'analyse.

D. Cytométrie de flux et marquages fluorescents

En complément des données sur la motilité spermatique acquises par le système CASA, la cytométrie de flux permet d'évaluer de nombreuses caractéristiques structurales des spermatozoïdes.

La technique de cytométrie de flux consiste en l'analyse de cellules en suspension dans un flux de liquide passant à grande vitesse devant un ou plusieurs lasers. La lumière émise par les cellules liées à un fluorochrome est capturée par des tubes photomultiplicateurs puis est convertie en un signal électronique qui est ensuite numérisé

et analysé par un logiciel de cytométrie. De plus, l'utilisation d'une large gamme de fluorochromes permet l'évaluation de nombreuses caractéristiques des spermatozoïdes.

Les avantages majeurs de cette technique sont sa capacité à analyser des milliers de cellules en quelques secondes ainsi que son approche multiparamétrique de la qualité de la semence (Vincent *et al.*, 2014).

Les différents paramètres analysés par la technique de cytométrie de flux sont décrits ci-dessous.

a. Viabilité / mortalité

Le premier paramètre étudié par cytométrie de flux est la viabilité des spermatozoïdes contenus dans l'échantillon de semence testé. Pour ce faire, le fluorochrome utilisé est l'iodure de propidium. Ce colorant connu pour identifier les cellules mortes pénètre à travers les membranes plasmiques endommagées et se lie à l'ADN. Sa présence est ensuite révélée par un laser de longueur d'onde de 488 nm lors du passage des cellules dans le cytomètre de flux. Cela permet ainsi de dénombrer les spermatozoïdes morts dans l'échantillon.

D'autres fluorochromes comme par exemple le SYBR-14 peuvent également être utilisés pour marquer l'intégrité de la membrane plasmique et ainsi la viabilité des spermatozoïdes (Vincent *et al.*, 2014).

b. Intégrité de l'acrosome

L'acrosome est une structure essentielle du spermatozoïde pour la fécondation. En effet, la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte ne peut pas se faire si la réaction acrosomique n'a pas préalablement eu lieu. La fusion de la membrane plasmique du spermatozoïde avec la membrane acrosomiale externe permet en effet la libération du contenu enzymatique de l'acrosome et par conséquent la pénétration de la zone pellucide de l'ovocyte par le spermatozoïde. Ainsi, pour que la semence soit fertile, il apparaît donc nécessaire que les spermatozoïdes qu'elle contient possèdent un acrosome intègre. Cette caractéristique peut être évaluée par cytométrie de flux en utilisant des lectines végétales reconnaissant les ligands acrosomiques. La lectine la plus fréquemment utilisée pour évaluer l'intégrité acrosomique est l'agglutinine d'*Arachis hypogaea* (cacahuète). Celle-ci se lie aux molécules de galactose de la membrane extérieure de l'acrosome et permet ainsi d'identifier les spermatozoïdes présentant un acrosome endommagé. Une autre lectine pouvant être utilisée est l'agglutinine du *Pisum sativum* (Pois cultivé) mais celle-ci présente l'inconvénient de former des liaisons non spécifiques avec d'autres zones des spermatozoïdes et certains éléments contenus dans le diluant de la semence.

L'agglutinine de *Pisum sativum* et l'agglutinine d'*Arachis hypogaea* sont généralement marquées avec des fluorochromes FITC (isothiocyanate de fluorescéine), ce qui leur permet d'être utilisées par tous les cytomètres (Vincent *et al.*, 2014).

c. Activité mitochondriale

Les mitochondries sont des organelles très importantes pour les spermatozoïdes puisqu'elles fournissent l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire et à la motilité spermatique. Ainsi, l'évaluation de leur activité est un des critères de l'analyse de la qualité de la semence.

Pour ce faire, plusieurs marqueurs peuvent être utilisés comme la Rhodamine 123 ou le colorant Mitotracker® qui ont la particularité de s'accumuler dans les mitochondries actives. Le marqueur le plus fréquemment utilisé est toutefois le JC-1 (iodure de 5,5, 6,6'-tétrachloro-1,1',3,3' tétraéthylbenzimidazolylcarbocyanine). Dans les spermatozoïdes contenant des mitochondries à potentiel de membrane élevé, et donc ayant une forte activité, le JC-1 pénètre dans les mitochondries où il forme des agrégats J qui deviennent rouge fluorescent. Dans les spermatozoïdes contenant des mitochondries avec un faible potentiel membranaire, JC-1 ne peut pas s'accumuler dans les mitochondries et reste donc dans le cytoplasme où il émet une fluorescence verte. Contrairement à la Rhodamine 123 et au Mitotracker, le JC-1 possède l'avantage de quantifier l'activité mitochondriale (Vincent *et al.*, 2014).

d. Intégrité de l'ADN

L'évaluation de l'intégrité de l'ADN est un élément important pour déterminer le potentiel de fertilité des spermatozoïdes.

La technique la plus utilisée pour évaluer l'intégrité de l'ADN est le test de structure de la chromatine des spermatozoïdes développé par Evenson et Jost. Le test de structure de la chromatine des spermatozoïdes utilise la double émission de fluorescence de l'acridine orange selon qu'elle se lie à l'ADN simple brin (fluorescence rouge) ou double brin (fluorescence verte). Après une étape de dénaturation, l'échantillon de sperme est incubé avec l'acridine orange, puis analysé par cytométrie en flux. La dénaturation va induire la formation d'ADN simple brin lorsque des cassures d'ADN sont présentes et générer une population hétérogène de fluorescence rouge et verte en fonction de l'intégrité de la chromatine. Le résultat le plus important obtenu lors du test de la structure de la chromatine du sperme est le rapport des fluorescences (rouge/verte) appelé indice de fragmentation de l'ADN. Un indice de fragmentation de l'ADN élevé est en corrélation avec un dommage élevé de l'ADN. L'indice de fragmentation de l'ADN a de plus montré une corrélation avec la fertilité chez différentes espèces.

Un autre test d'évaluation de l'intégrité de l'ADN mis au point pour la cytométrie en flux est le test TUNEL (terminal transferase dUTP nick end labeling : marquage de la fin des ruptures de l'ADN par l'enzyme dUTP transférase terminale) qui permet d'identifier les ruptures de brins d'ADN. La transférase incorpore des nucléotides modifiés associés à un fluorochrome aux sites de rupture de l'ADN. Les cellules marquées qui en résultent peuvent ensuite être analysées par cytométrie de flux (Vincent *et al.*, 2014).

e. Flux de calcium

Le dernier paramètre évalué par cytométrie de flux est le flux de calcium intracellulaire des spermatozoïdes. Le flux de calcium est l'un des éléments principaux impliqués dans le processus de capacitation des spermatozoïdes. En effet, l'augmentation du calcium intracellulaire conduit à la phosphorylation de résidus tyrosine et des résidus de sérine dans les protéines régulant la cascade de signalisation, déclenchant ainsi le processus de capacitation.

Les colorants les plus couramment utilisés pour déterminer la concentration de calcium intracellulaire dans les spermatozoïdes sont ceux de la famille Fluo-3/4. Le Fluo-3 est une molécule non fluorescente mais lorsque des ions calciums entrent dans la cellule et se lient au Fluo-3 une fluorescence peut alors être mise en évidence par un laser de longueur 488 nm au cytomètre de flux. Le Fluo-4 est un dérivé du Fluo-3 dont la fluorescence est plus intense.

Un autre fluorochrome pouvant être utilisé pour évaluer le flux calcique est le rouge Fura. Le rouge Fura est un fluorochrome dont l'émission de fluorescence diminue lors de la fixation du calcium (Vincent *et al.*, 2014).

Une fois la qualité de la semence analysée les échantillons vont pouvoir poursuivre le processus afin d'être mis en paillettes et conservés. Pour cela ils vont tout d'abord passer par l'étape de dilution, étape au cours de laquelle les traitements antibiotiques sont ajoutés aux doses de semence.

4. Le traitement actuel des doses de semence : les antibiotiques utilisés et leurs limites

Les antibiotiques sont aujourd'hui considérés comme un composant indispensable des diluants ajoutés à la semence lors de sa préparation. Ils sont en effet utiles à plusieurs titres, tant dans la prévention des épizooties que dans le maintien de la fertilité de la semence. Ainsi, un grand nombre de classes différentes d'antibiotiques sont utilisées dans les doses de semence destinées à l'insémination artificielle. Certains de ces antibiotiques font partie de ceux qui, en médecine humaine, sont classés comme antibiotiques d'importance critique par l'OMS (Organisation Mondiale pour la Santé) depuis 2012. C'est le cas par exemple du Cefotiofur, du Cefdinir ou encore de la Cefoperazone, tous les trois étant des céphalosporines de 3^{ème} génération. De plus, les antibiotiques utilisés sont généralement ceux possédant un large spectre d'activité, c'est-à-dire des agents très puissants. Ils sont en outre associés dans diverses combinaisons afin de réduire la toxicité de chaque molécule pour les spermatozoïdes.

Ainsi, l'utilisation des antibiotiques et les problèmes de résidus et de résistances associés sont de plus en plus mis en avant et représentent une menace grandissante pour la santé humaine et animale (Aarestrup *et al.*, 2008). En effet, il en résulte l'introduction d'agents antimicrobiens et de bactéries potentiellement résistantes dans les exploitations

par le biais de l'insémination artificielle. Les antibiotiques et les bactéries potentiellement multirésistantes pénètrent alors dans l'environnement (Heuer et Smalla, 2007).

L'ajout d'antibiotiques dans les doses de semence se justifie par deux raisons majeures : la lutte contre les épizooties et la préservation de la semence vis-à-vis de contaminants bactériens qui altèrent sa qualité et en particulier sa fertilité. Ainsi, pour le commerce international, l'Organisation Mondiale de la Santé Animale a défini des recommandations concernant la concentration minimale d'antibiotique par millilitre que doivent contenir les doses de semence pour l'insémination artificielle. Ces recommandations sont présentées dans le *Code sanitaire pour les animaux terrestres* (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b) et sont les suivantes : chaque millilitre de semence doit contenir un mélange d'antibiotique à l'activité bactéricide au moins équivalente à celle des mélanges suivants : soit gentamicine (250 µg), tylosine (50 µg), lincomycine – spectinomycine (150/300 µg) ; soit pénicilline (500 UI), streptomycine (500 µg), lincomycine – spectinomycine (150/300 µg) ; soit amikacine (75 µg), divecacine (25 µg). Ces concentrations minimales en antibiotiques sont également reprises dans les législations nationales et internationales ainsi que dans les directives de la Commission Européenne (Communauté Economique Européenne, 2003, 1990).

Les antibiotiques traditionnellement utilisés par les établissements de préparation de la semence étaient des associations de pénicillines et streptomycines. Aujourd'hui les aminosides, et particulièrement la gentamicine, sont largement utilisés (Schulze *et al.*, 2020b). Des exemples de traitements antibiotiques utilisés dans les doses de semence sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Exemples de traitements antibiotiques utilisés dans les doses de semence de taureaux, et verrats (Santos et Silva, 2020).

	Antibiotiques	Concentrations	Diluants	Température de conservation	Durée de conservation
Taureaux	Streptomycine et pénicilline	100 à 1000 µg/mL de chaque	Citrate de sodium et jaune d'oeuf	4,5°C	20 jours
	Gentamicine, tylosine, lincomycine et spectinomycine	500 µg/mL, 100 µg/mL, 300 µg/mL et 600 µg/mL	Acide tris-citrique	- 196°C	1 jour
	Ceftiofur et tylosine	200 µg/mL et 100 µg/mL	Bioxcell CSS I et II	- 145°C	7 jours
Verrats	Gentamicine et florfenicol	100 µg/mL et 100 µg/mL	Biosolwen s Plus	15°C	10 jours
	Gentamicine	250 µg/mL	Beltsville Thawning Solution ou Androstar Premium	17°C	3 jours

Les durées de conservations indiquées dans ce tableau sont des exemples et dépendent des diluants utilisés, toutefois selon la nature de ces derniers des durées bien plus longues peuvent être obtenues, en particulier sous forme congelée.

Les antibiotiques sont utilisés pour la conservation de la semence de toutes les espèces mais dans des concentrations variables. En effet, la quantité d'antibiotiques utilisée est bien plus importante dans l'espèce porcine que dans les espèces bovine ou équine. Cela résulte de plusieurs caractéristiques de l'insémination artificielle chez les porcins. Premièrement, alors que les semences bovine et équine peuvent être conservées sous forme réfrigérée ou congelée, la semence porcine est quant à elle conservée uniquement sous forme réfrigérée. Cela s'explique par la sensibilité des spermatozoïdes de verrats au choc par le froid, la semence doit donc être conservée à 17°C pour en préserver la fertilité (Schulze *et al.*, 2020b).

De plus, les doses de semence porcine ayant un volume plus important que celles bovine ou équine, elles requièrent alors une quantité plus importante d'antibiotiques pour obtenir une concentration similaire.

Ainsi, ces éléments montrent que si l'utilisation des antibiotiques doit être amenée à être questionnée chez toutes les espèces, le secteur de l'insémination artificielle porcine en particulier doit réfléchir à des alternatives à l'utilisation conventionnelle des antibiotiques.

Au cours des dernières années une augmentation continue des résistances bactériennes a été observée à travers le monde pour toutes les classes d'antibiotiques utilisées pour la conservation de la semence. Ainsi une étude rétrospective réalisée en 2005 aux États-Unis mettait déjà en évidence une bactériospermie dans un tiers des doses de semence utilisées en IA et 86 % des bactéries isolées à partir de ces doses présentaient une capacité de résistance aux antibiotiques habituellement utilisés dans les doses de semence tels que l'amoxicilline, la gentamicine, la lincomycine, la tylosine et la spectinomycine (Althouse et Lu, 2005). De même, entre 2010 et 2011, en Allemagne et Autriche, une étude a mis en évidence la présence de bactéries résistantes à la gentamicine dans 26 % des échantillons de sperme dilué et dans 66,7 % des doses de semence étudiées dans des centres d'IA porcins (Schulze *et al.*, 2015b). La plupart des espèces bactériennes isolées présentant des résistances aux antibiotiques sont des bactéries de l'environnement mais certaines sont aussi des pathogènes opportunistes à l'origine d'infection nosocomiales chez l'Homme et l'animal (Wallmann *et al.*, 2003). Ainsi, plusieurs agents responsables d'infections nosocomiales, tels que *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens* et *Stenotrophomonas maltophilia*, ont été isolés à plusieurs reprises dans du sperme de verrat dilué (Althouse et Lu, 2005 ; Schulze *et al.*, 2015b).

Les résistances bactériennes observées dans les centres d'IA n'exposent donc pas seulement les personnes qui manipulent les diluants de sperme mais une population bien plus large du fait de leur échappement dans l'environnement. Le passage d'agents antimicrobiens et de bactéries résistantes dans l'environnement est dû à plusieurs phénomènes.

Le premier provient du reflux naturel du sperme dans le lisier après l'insémination artificielle. Cela concourt à répandre dans les exploitations des antibiotiques et des bactéries multirésistantes. De plus, l'épandage du lisier est responsable de la diffusion dans l'environnement de ces agents antimicrobiens et bactéries multirésistantes. Ainsi, Heuer et

Smalla, (2007) ont démontré une augmentation des résistances bactériennes aux antibiotiques dans le sol pendant au moins deux mois sur les terrains ayant fait l'objet d'un épandage de lisier de porcs exposés aux antibiotiques. L'étude mettait en évidence une augmentation du nombre de bactéries résistantes ainsi qu'une augmentation de la fréquence de transfert de plasmides codant pour les gènes de résistance aux antibiotiques auxquels les porcs avaient été exposés. Les auteurs ont donc conclu que les résultats obtenus mettaient en évidence que l'épandage de lisier de porcs traités aux antibiotiques était responsable de l'augmentation de la diffusion de résistances aux antibiotiques dans les communautés bactériennes du sol.

De plus, il est à noter que par ce mécanisme ce serait environ 4,1 millions de litres en Europe et 14 millions de litres dans le monde de diluant de semence contenant des antibiotiques qui gagnerait l'environnement chaque année (Schulze *et al.*, 2020).

Une seconde source de contamination de l'environnement réside dans l'élimination des diluants ou des doses d'IA non utilisés (Schulze *et al.*, 2017).

Pour finir, les germes présents dans les laboratoires de traitement de la semence ainsi que de faibles doses d'antibiotiques se retrouvent dans les systèmes de traitement des eaux qui fonctionnent comme un réservoir de germes résistants aux antibiotiques et représentent alors un risque de contamination de l'eau et de l'environnement par des bactéries multirésistantes (Payne *et al.*, 2008).

Par ces mécanismes, de nombreuses classes d'antibiotiques se retrouvent dans les sols autour des exploitations mais aussi dans les eaux de surfaces et les eaux souterraines à des concentrations pouvant être supérieures à 100 µg/L. Cela conduit dès lors à l'apparition dans l'environnement de bactéries résistantes pouvant compromettre la santé humaine et animale (Campagnolo *et al.*, 2002 ; Heuer et Smalla, 2007).

Cependant, une diminution des concentrations d'antibiotiques dans des conditions non maîtrisées et en-dessous de la concentration minimale inhibitrice résulterait en une augmentation significative de l'apparition de bactéries résistantes (Schwarz et Chaslus-Dancla, 2001 ; Schulze *et al.*, 2017).

Ainsi ces observations soulèvent la nécessité de développer de nouvelles pratiques, permettant de réduire les quantités d'antibiotiques utilisées dans les doses de semence, et par là les risques de résistances qui y sont associés, tout en préservant la qualité sanitaire de la semence.

Troisième partie : agents pathogènes pouvant être transmis par la semence bovine

De nombreux agents pathogènes peuvent se trouver dans la semence des taureaux et ainsi conduire à la transmission vénérienne de maladies lors de la monte ou de l'insémination artificielle. Ainsi, leur dépistage est particulièrement important afin d'éviter la diffusion dans les cheptels, d'autant plus qu'avec l'insémination artificielle un petit nombre de taureaux est utilisé pour féconder de très nombreuses vaches, l'utilisation de semence contaminée par un pathogène peut donc conduire à répandre celui-ci à une grande échelle.

Les maladies transmissibles par voie sexuelle peuvent être de nature virale, bactérienne, protozoaire ou parasitaire.

Les maladies virales présentant une transmission vénérienne sont (Institut de l'élevage, 2008 ; Givens, 2018 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b) :

- La Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (IBR),
- La Diarrhée Virale Bovine (BVD),
- La Fièvre Catarrhale Ovine (FCO) (BTV sérotype 8),
- La Leucose Bovine Enzootique (LBE),
- La Dermatose Nodulaire Contagieuse des Bovins (DNCB),
- La Fièvre Aphteuse (FA),
- L'infection par le virus Schmallenberg.

Des bactéries et protozoaires peuvent également être transmis par la semence (Institut de l'élevage, 2008 ; Givens, 2018 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b) :

- *Brucella abortus*,
- *Campylobacter fetus venerealis*,
- *Chlamydia* spp.,
- *Coxiella burnetti*,
- *Escherichia coli* vérotoxino-gène,
- *Histophilus somni*,
- *Leptospira* spp.,
- *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*,
- *Mycobacterium bovis*,
- *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*,
- *Ureaplasma diversum*,

- *Neospora caninum*,
- *Tritrichomonas foetus*.

Ainsi, dans le chapitre 4 du Code sanitaire pour les animaux terrestres, l'Organisation Mondiale de la Santé Animale recommande de rechercher dans la semence des taureaux servant à l'insémination artificielle les maladies suivantes (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b) :

- Brucellose,
- Diarrhée virale bovine,
- Campylobactériose à *Campylobacter fetus* var. *venerealis*,
- Tritrichomonose à *Tritrichomonas foetus*,
- Rhinotrachéite infectieuse bovine,
- Fièvre catarrhale ovine,
- Tuberculose.

En plus de la recherche de l'agent pathogène dans la semence, le dépistage de certaines maladies peut également s'appuyer sur des analyses sérologiques. En effet, des facteurs tels que la réactivation d'un pathogène, une infection persistante ou prolongée peuvent influencer sur la présence du pathogène dans la semence et ainsi rendre le diagnostic direct insuffisant. Pour pallier à cela l'Organisation Mondiale de la Santé Animale recommande donc pour plusieurs maladies d'intérêt d'associer le diagnostic direct du pathogène dans la semence à un diagnostic sérologique afin de confirmer le statut indemne des taureaux en station.

Cependant, il est à noter que, bien que présents dans la semence, certains pathogènes ne sont que très rarement responsables d'infection de la mère ou du fœtus. C'est le cas par exemple de la Leucose Bovine Enzootique dont la transmission par voie vénérienne demeure exceptionnelle.

Enfin, certaines maladies présentes dans la semence bovine sont de plus des zoonoses, comme par exemple la Brucellose ou la Tuberculose, leur identification est donc particulièrement importante pour leur gestion afin de préserver la santé publique.

Ainsi, nous allons nous intéresser dans cette partie à la description des maladies d'intérêt (réglementées ou zoonotiques) transmises par voie vénérienne, en étudiant pour chacune d'entre elles les caractéristiques de l'agent pathogène puis l'épidémiologie et la distribution géographique et enfin le diagnostic sérologique lorsque celui-ci est disponible. Nous intéresserons à la transmission vénérienne de ces maladies et à l'impact que pourrait avoir l'utilisation de semence contaminée lors de l'insémination artificielle, nous nous attacherons donc plus précisément à la description des éléments ayant trait à la présence des agents pathogènes dans la semence.

1. La rhinotrachéite infectieuse bovine

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

La Rhinotrachéite Infectieuse Bovine est une maladie causée par un virus à ADN de la famille des Herpesvirus : l'herpesvirus bovin de type 1 (BoHV-1).

Comme l'ont démontré les études de Bielanski *et al.* (1988) et van Oirschot (1995), le virus peut être retrouvé dans la semence des taureaux infectés, il se localise alors dans le liquide séminal (Weiblen *et al.*, 1992 ; van Oirschot, 1995 ; Vogel *et al.*, 2004 ; Wrathall *et al.*, 2006). Le virus peut également se lier par une association extracellulaire aux spermatozoïdes et interagir avec ceux-ci de façon à inhiber la liaison spermatozoïde-zona. Enfin, la présence du virus dans la semence est également responsable d'une diminution de sa fertilité (Tanghe *et al.*, 2005).

Le BoHV-1 peut pénétrer dans l'organisme par voie génitale ou respiratoire. Une fois dans l'organisme et après une phase de virémie, celui-ci s'installe à l'état latent dans les ganglions trijumeaux et est ainsi responsable d'une infection à vie. Il peut ensuite être réactivé à la faveur d'un stress, conduisant à la production et l'excrétion de nouvelles particules virales (Institut de l'élevage, 2008).

Les femelles contaminées par le BoHV-1.2 par voie vénérienne peuvent développer une forme particulière de la maladie : la Vulvovaginite Pustuleuse Infectieuse (VPI). Cette forme d'IBR se manifeste par des plaques, des érosions, des ulcères et une inflammation des muqueuses vaginales et vulvaires. Comme pour les autres formes d'IBR, une propagation du virus dans l'organisme peut se produire malgré la localisation des signes au niveau de l'appareil reproducteur *caudal*. Ainsi, de l'hyperthermie, de la léthargie et de l'anorexie peuvent accompagner les lésions génitales. De plus, l'avortement est une conséquence possible de la forme systémique de la VPI et est plus fréquent lorsque des signes systémiques graves apparaissent. L'avortement peut survenir à n'importe quel stade de la gestation, mais il survient plus fréquemment dans la dernière moitié de la gestation.

La VPI peut se transmettre par le coït avec des taureaux infectés présentant des lésions sur le prépuce ou le pénis, ainsi que par l'utilisation de semence infectée lors d'IA (Gilbert, 2017).

Il s'agit d'une maladie non zoonotique.

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

L'IBR est une maladie de répartition mondiale, avec une prévalence variable d'un pays ou d'une région à l'autre.

Il en est de même en France où la situation épidémiologique concernant l'IBR est hétérogène. La France est classée comme pays non indemne avec un taux de prévalence

national de 2,5 % en 2020 et des taux de prévalence variables entre les départements (de 0 à 43 %) (Figure 2). Le taux d'incidence national était de 0,35 % en 2020 avec des variations départementales allant de 0 à 21 % (Figure 3).

Figure 2 : Prévalence de cheptels atteints d'IBR, par département, au 30 juin 2020 (données GDS France) (ANSES et al., 2021).

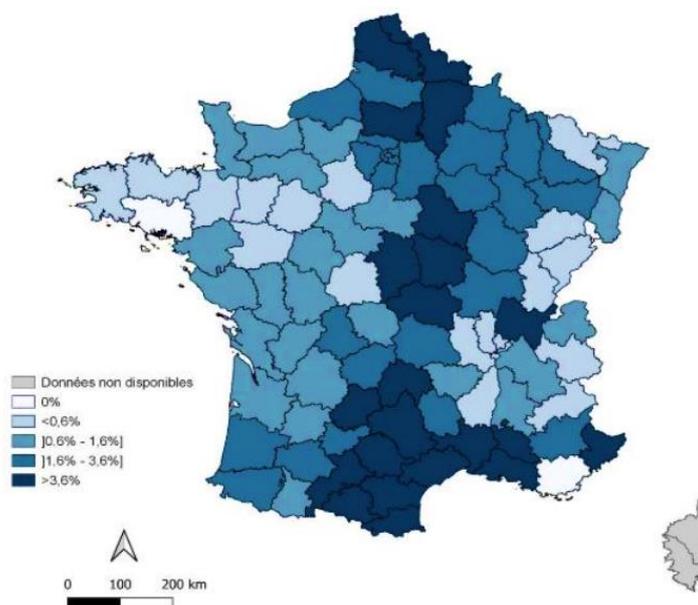
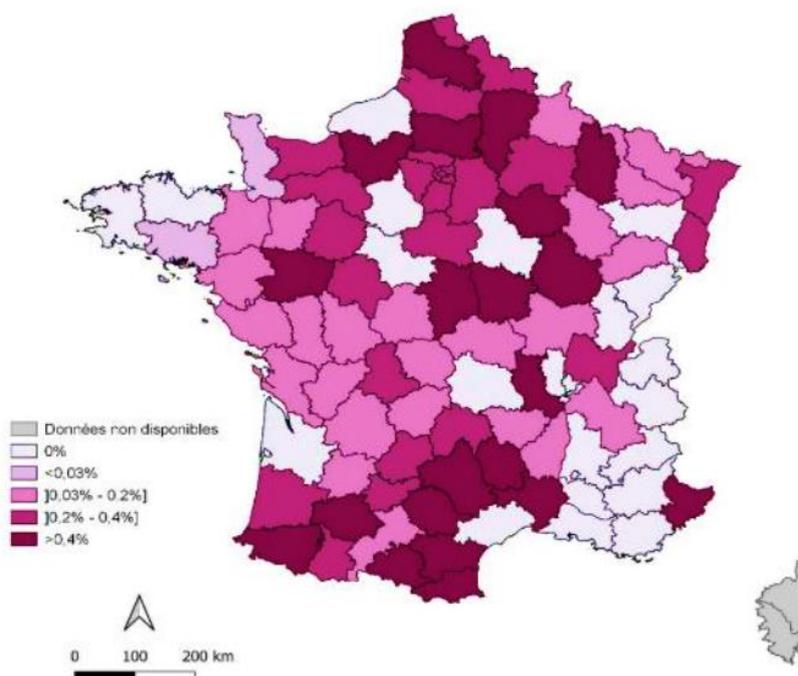


Figure 3 : Taux d'incidence de l'IBR dans les cheptels, par département, au 30 juin 2020 (données GDS France) (ANSES et al., 2021).



Le bilan de la surveillance réglementée de l'IBR en France met en évidence une diminution des taux d'incidence depuis plusieurs campagnes consécutives depuis 2016 (Figure 4), résultat du programme européen d'éradication.

Figure 4 : Évolution du taux d'incidence national des cheptels atteints d'IBR entre 2016 et 2020 (données GDS France) (ANSES et al., 2021).



Enfin, l'IBR est une maladie classée CDE par la Loi Santé Animale (LSA) européenne (Commission Européenne, 2018 ; Légifrance, 2021) la rendant ainsi soumise à éradication optionnelle et appartient aux maladies listées au chapitre 1.3 du *Code sanitaire pour les animaux terrestres* de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale et doit en tant que telle y être notifiée (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b).

Du fait des bas taux de prévalence et de la faible expressivité clinique de la maladie dans les élevages atteints, son enjeu est actuellement plus économique que médical, compte-tenu de la prise en compte de l'infection dans les échanges nationaux et internationaux de bovins.

C. Diagnostic sérologique

Afin de respecter les normes fixées au chapitre 4.7 du *Code sanitaire pour les animaux terrestres* de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale concernant les conditions applicables aux examens sanitaires des taureaux en centre d'insémination, les taureaux peuvent être amenés à subir plusieurs examens sérologiques afin de rechercher la présence d'anticorps anti-BoHV-1.

Tout d'abord, si le pays ou la zone d'origine des taureaux n'est pas officiellement reconnue indemne d'IBR, ces derniers doivent présenter un résultat négatif à une épreuve sérologique de recherche du virus de l'IBR à l'entrée dans la zone d'isolement préalable à l'admission dans le centre d'insémination artificielle.

Un second examen sérologique devra ensuite être réalisé au moins 21 jours après l'admission des taureaux dans la zone d'isolement et se révéler négatif pour que le prélèvement de la semence puisse être effectué. (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021a)

Dans ce cadre, le diagnostic sérologique de l'IBR peut reposer sur différentes techniques dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de l'IBR (d'après de Wit et al., 1998¹ ; Valas et al., 2019² ; Sarangi et al., 2021³).

Technique	Sensibilité	Spécificité
ELISA-bloquant-gB	99,3 à 100 % ²	99,9 % à 100 % ²
ELISA-bloquant-gE	99,6 % ²	99,7 % ¹
ELISA-indirect-IgG	99,4 % à 100 % ³	69,6 à 76,2 % ³
ELISA-indirect-gB	99,4 à 99,7 % ³	76,9 à 82,5 % ³
ELISA-bloquant + ELISA-indirect	100 % ¹	100 % ¹

D'après : de Wit et al., 1998¹ ; Valas et al., 2019² ; Laxmi Narayan et al., 2021³)

Les méthodes utilisées en France au cours des campagnes d'éradication de l'IBR sont les ELISA-bloquants détectant les glycoprotéines B ou E. L'ELISA-bloquant détectant la glycoprotéine E présente la caractéristique, contrairement à la détection de la glycoprotéine B, de permettre de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés avec un vaccin délété de la glycoprotéine E.

Afin de gagner en sensibilité, l'association en série d'un ELISA-bloquant et d'un ELISA-indirect avait été utilisée pour le programme d'éradication de l'IBR aux Pays-Bas, donnant des résultats satisfaisants (de Wit et al., 1998).

Enfin, il est à noter que des réactions croisées avec des anticorps anti-BoHV2 peuvent donner des résultats faussement positifs aux tests ELISA, hormis les tests ELISA détectant la glycoprotéine E (Valas et al., 2019).

2. La diarrhée virale bovine

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

La BVD est une maladie causée par un Pestivirus, un virus à ARN de la famille des Flaviviridae. La souche de virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) peut être de type cytopathogène (CP) ou non-cytopathogène (NCP). Un individu peut être infecté de manière concomitante par les deux types de souches, concourant alors à l'apparition de la Maladie des muqueuses (Institut de l'élevage, 2008).

Le virus de la BVD peut infecter de nombreux tissus chez les animaux infectés, appartenant au tractus digestif, à l'appareil respiratoire ou encore au tractus génital, auquel nous allons nous intéresser. Le virus connaît plusieurs localisations dans le tractus génital et notamment dans les vésicules séminales, la prostate et l'épididyme (Kirkland et al., 1991) mais aussi dans les cellules de Sertoli (cellules testiculaires situées dans l'épithélium des tubes séminifères, qui ont un rôle de sécrétion endocrine et nourricier, de soutien et de maturation des cellules de la spermatogénèse.) et les spermatogonies (cellule souche formant par division les spermatoctes) (Borel et al., 2007; Newcomer et al., 2014). Le virus peut également être présent directement dans la semence des taureaux, qu'ils soient

infectés de manière transitoire ou permanente. L'infection testiculaire engendrée peut elle-même être persistante ou prolongée.

De plus, une particularité de la BVD est que certains individus peuvent être Infectés Permanents Immunotolérants (IPI). Un bovin IPI est un animal qui porte et excrète le virus de sa naissance à sa mort. Un animal devient IPI lorsqu'il est infecté durant la gestation, entre le 30^{ème} et 125^{ème} jour. Ainsi, il a été démontré que les IPI excrètent massivement le BVDV dans leurs sécrétions corporelles, dont la semence. De plus, les taureaux IPI ont généralement un sperme de mauvaise qualité, hautement infectieux, et possédant une fertilité réduite. Toutefois, un cas de transmission du BVDV lors d'insémination avec de la semence congelée appartenant à un taureau IPI a été décrit et met en évidence le rôle possible des IPI dans la transmission du BVDV par la semence. Néanmoins, de tels cas restent rares car les animaux IPI atteignent rarement la maturité (Meyling et Jensen, 1988 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018a).

Lors de la présence du virus dans la semence celui-ci est alors lié par une association extracellulaire aux spermatozoïdes. De plus, la force de cette liaison est si importante qu'elle ne peut pas être rompue par centrifugation à travers un gradient de percoll ou par les techniques de filtration sur laine de verre ou sur billes de verre (Bielanski *et al.*, 1992).

Enfin, il est à noter que le virus persiste longtemps dans l'appareil reproducteur (jusqu'à 53 jours) (Passler et Walz, 2009). Ainsi, une insémination avec de la semence contaminée, même lorsque l'IA n'aboutit pas à la fécondation, peut conduire à la persistance du BVDV dans le tractus génital femelle et ainsi infecter un embryon ou un fœtus conçu ultérieurement (Eaglesome et Garcia, 1997; Givens, 2018).

Il s'agit d'une maladie non zoonotique.

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La BVD connaît une répartition mondiale. Cependant la situation épidémiologique est contrastée, certains pays étant indemnes tandis que la prévalence sérologique reste élevée dans de nombreux autres (40 à 80 %) (Prikazsky et BVD observatoire, 2021).

En France, la prévalence sérologique est de l'ordre de 70 % et la prévalence d'IPI serait de l'ordre de 0 à 2 % tandis qu'entre 8 et 20 % des fœtus seraient infectés. En conséquence, la BVD génère d'importantes pertes économiques pour la filière (Peroz et Ganière, 2021 ; Prikazsky et BVD observatoire, 2021).

Enfin, il s'agit d'une maladie classée CDE par la Loi Santé Animale, elle est donc soumise à éradication optionnelle (Commission Européenne, 2018 ; Légifrance, 2021). Il s'agit de plus d'une maladie à notifier à l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b).

C. Diagnostic sérologique

Les anticorps dirigés contre le BVDV peuvent être détectés dans le sérum des bovins par un test de neutralisation virale (TNV) ou par technique ELISA.

Les tests sérologiques sont utilisés pour identifier le niveau d'immunité des troupeaux, pour détecter la présence d'animaux IPI dans un troupeau, pour aider à l'investigation des maladies reproductives (avortements, malformations) et de la possible implication du BVDV dans celles-ci, pour établir le statut sérologique des taureaux utilisés pour la collecte de sperme et pour déterminer si une infection récente a eu lieu.

Le TNV est plus fréquemment utilisé à des fins réglementaires (par exemple pour les tests des donneurs de sperme), tandis que les tests ELISA sont couramment utilisés pour des applications diagnostiques (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018a).

Test de neutralisation virale (TNV) :

Le choix de la souche virale à inclure dans un TNV est très important. En effet, aucune souche unique n'est susceptible d'être idéale pour toutes les circonstances, en pratique il faut donc en choisir une qui détecte la plus grande proportion de réactions sérologiques dans la population bovine locale. Ainsi, il est important que le BVD type 1 et le BVD type 2 soient utilisés dans le test et pas seulement celui que le diagnostiqueur pense être présent, car cela pourrait conduire à un résultat faussement négatif. La sensibilité de ce test peut donc varier de moyenne à très élevée selon la ou les souches utilisées en comparaison avec celles circulant dans la population testée (Sandvik, 2005 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018a).

ELISA :

Les méthodes d'ELISA indirect ou ELISA bloquant peuvent toutes deux être utilisées pour le diagnostic sérologique de la BVD.

Comme pour le test de neutralisation virale, les tests ELISA configurés à l'aide de l'antigène d'un génotype de BVD peuvent ne pas détecter efficacement les anticorps induits par un autre génotype. Les tests doivent donc être sélectionnés pour leur capacité à détecter les anticorps dirigés contre le spectre de génotypes et de souches circulants dans la région où le test doit être réalisé (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018a).

Les caractéristiques des tests de neutralisation virale et ELISA sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la BVD (Sandvik, 2005 ; Hanon et al., 2018 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018a).

Technique	Sensibilité	Spécificité
TNV	Moyenne à élevée*	Bonne
ELISA	93,0 à 98,7 %**	94,3 à 99,1 %**

* Selon l'adéquation entre les souches utilisées et les souches circulantes.

** Selon l'adéquation entre les souches utilisées et les souches circulantes et la méthode utilisée.

3. La fièvre catarrhale ovine

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

La FCO est une maladie due à un Orbivirus, virus à ARN appartenant à la famille des Reoviridae : le BTV (BlueTongue Virus). Il en existe de multiples sérotypes. La maladie affecte les ruminants, plus particulièrement les ovins, et plus rarement les bovins.

Bien que la transmission de la maladie soit presque exclusivement assurée par des arthropodes piqueurs du genre *Culicoides*, une transmission vénérienne est également possible. En effet, le virus peut être retrouvé dans la semence des taureaux infectés et conduire à l'infection transplacentaire du fœtus, comme cela a été démontré en particulier pour le sérotype 8 du BTV (De Clercq *et al.*, 2008).

Plusieurs mécanismes sont à l'origine de la présence du BTV dans la semence. Le premier résulte de l'association du virus aux globules rouges et aux cellules sanguines mononucléaires. La fuite de ces cellules, due à des lésions microvasculaires causées par l'inflammation du tractus génital mâle, conduit au passage du BTV dans la semence (Wrathall *et al.*, 2006). Cependant, le virus vivant BTV-8 peut également se retrouver libre dans la semence de taureaux naturellement infectés, même en l'absence de globules rouges (Vanbinst *et al.*, 2010). Il peut également réaliser une association extracellulaire avec les spermatozoïdes. La présence du virus dans la semence est responsable d'une diminution de la motilité spermatique post-décongélation et d'une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques (Muller *et al.*, 2010). De plus, une infertilité temporaire peut également être observée chez les taureaux infectés (Vanbinst *et al.*, 2010).

Enfin, lorsque qu'une femelle gestante est infectée, une transmission transplacentaire peut avoir lieu et causer, selon la souche virale impliquée, de la mortalité embryonnaire précoce, des avortements ou encore la naissance de veaux malformés (Vanbinst *et al.*, 2010).

La maladie n'est pas zoonotique.

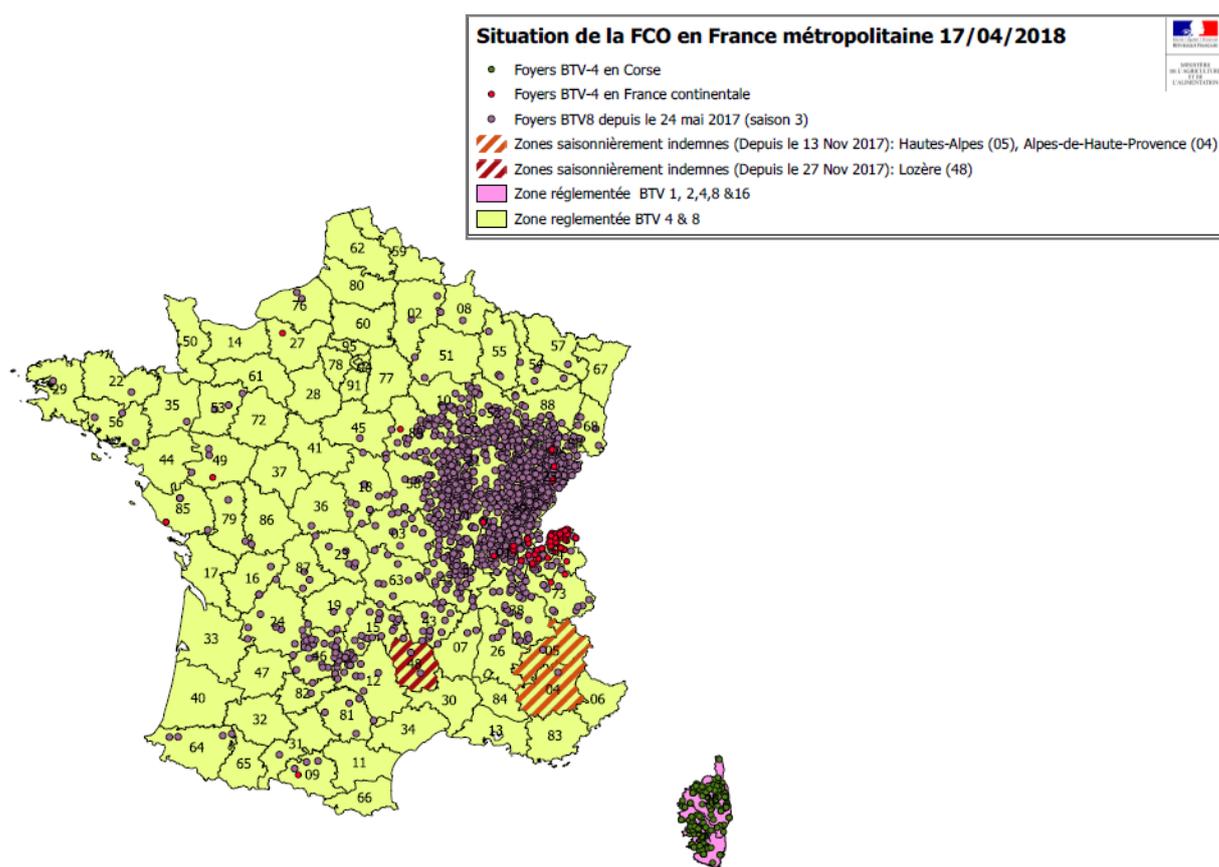
B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La FCO est une maladie cosmopolite. Originaires d'Afrique du Sud, elle a ensuite été détectée dans la plupart des pays tropicaux et subtropicaux sur tous les continents. L'épidémiologie étant dominée par le rôle des culicoïdes dans la transmission du virus et la maladie n'étant pas contagieuse, la FCO est donc limitée aux zones géographiques où le vecteur compétent est présent. Elle dispose toutefois d'une capacité d'extension géographique importante par plusieurs mécanismes tels que le déplacement de ruminants virémiques, le transport passif de culicoïdes ou encore le déplacement naturel des vecteurs.

En Europe, 9 sérotypes du BTV ont été recensés au cours des 15 dernières années. L'épizootie la plus importante a eu lieu en 2006 et a conduit à l'émergence et la propagation du sérotype 8 sur le continent. Les sérotypes y circulant depuis 2019 sont les sérotypes 1, 3, 4, 8 et 16, avec une grande majorité de foyers due aux sérotypes 4 et 8.

En France continentale circulent actuellement les sérotypes 4 et 8 pour lesquels l'ensemble du territoire est classé « zone réglementée », ceux-ci étant considérés comme enzootiques. Les dernières données publiées en janvier 2022 par le Ministère de l'Agriculture concernant la situation épidémiologique de la FCO faisaient état de près de 3000 cas de BTV-8 rapportés entre septembre 2017 et fin 2019, soit une prévalence nationale annuelle de 0,016 % (Figure 5).

Figure 5 : Situation de la FCO en France métropolitaine au 17 avril 2018 (Ministère de l'Agriculture et Xicluna, 2022).



La réémergence en France continentale du BTV-8 entre 2015 et 2018 témoigne de l'importance du contrôle de la qualité microbiologique de la semence pour la maîtrise des épizooties. En effet, selon l'hypothèse actuelle, l'origine de la réintroduction du BTV-8 serait la réutilisation de semence congelée contaminée lors de la 1^{ère} émergence en 2006, justifiant ainsi les restrictions appliquées pour le commerce des animaux et de leur semence (Plateforme Epidémiosurveillance Santé Animale, 2020 ; Peroz et Ganière, 2021 ; Ministère de l'Agriculture et Xicluna, 2022).

L'importance de la FCO résulte de sa morbidité importante et surtout des conséquences économiques qu'elle engendre via les restrictions au commerce des animaux et de leur semence et embryons.

La FCO est classée CDE dans le cadre de la LSA (Commission Européenne, 2018 ; Légifrance, 2021). Il s'agit de plus d'une maladie devant être notifiée à l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b).

C. Diagnostic sérologique

La réponse sérologique au BTV apparaît 7 à 14 jours après l'infection par le virus. Les animaux infectés produisent des anticorps anti-BTV neutralisants et non neutralisants qui persistent généralement longtemps dans l'organisme. Le test immuno-enzymatique (ELISA) et le test de neutralisation virale (TNV) sont les tests sérologiques les plus fréquemment utilisés. Un test d'immunodiffusion sur gel d'agar (AGID) est également disponible mais est peu utilisé en raison de son défaut de spécificité.

c-ELISA :

Un test ELISA compétitif utilisant des anticorps monoclonaux pour détecter spécifiquement les anticorps anti- BTV (spécifiques du sérotype) est le test recommandé pour certifier que les animaux sont indemnes d'infection avant le mouvement ; ce test étant très sensible et spécifique, rapide, peu coûteux et fiable (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021c). Le test ELISA compétitif permet de mesurer les anticorps spécifiques du BTV sans détecter d'anticorps provenant de réactions croisées avec d'autres Orbivirus. Cela lui confère ainsi une très bonne spécificité.

Toutefois, bien que le test ELISA possède une très bonne sensibilité il peut présenter une sensibilité réduite pour certains sérotypes (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021c). *Test de neutralisation virale (TNV) :*

Le TNV permet d'identifier les anticorps neutralisants spécifiques du sérotype ainsi que de déterminer leur titre. Il s'agit d'un test supplémentaire important dans les zones endémiques où plusieurs sérotypes sont susceptibles d'être présents. Sa capacité d'identifier le sérotype impliqué dans un foyer est essentielle pour mettre en place des mesures de contrôle appropriées, telles que la vaccination ou la restriction des mouvements d'animaux (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021c).

Le test de neutralisation virale est généralement reconnu comme le plus sensible et le plus spécifique des tests disponibles pour la détection sérologique de l'infection par le BTV chez les ruminants (Reddington *et al.*, 1991).

Test d'immunodiffusion sur gel d'agar (AGID) :

L'un des principaux inconvénients de l'AGID utilisé pour le diagnostic sérologique du BTV est son manque de spécificité, en effet, il ne différencie pas les anticorps des sérogroupes du BTV de d'autres virus appartenant à la famille des Orbivirus. Par conséquent, il ne peut pas être utilisé de manière définitive pour détecter les anticorps du BTV car une réaction positive peut être le résultat d'une infection par une autre espèce d'Orbivirus. Toutefois, le test AGID est simple à réaliser et l'antigène utilisé dans le test est relativement facile à

produire. Ainsi, depuis 1982, le test fait partie des procédures de test standard pour les mouvements internationaux de ruminants, mais il n'est plus considéré comme suffisamment précis pour être utilisé à l'appui des mouvements internationaux de ruminants. L'obtention d'un résultat positif à ce test implique donc de reconstrôler l'échantillon de sérum par un test spécifique des sérogroupes du BTV (ELISA ou TNV) (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021c).

Les caractéristiques des tests de détection sérologiques de la FCO sont présentées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la FCO (Afshar et al., 1989 ; Reddington et al., 1991 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021c).

Technique	Sensibilité	Spécificité
c-ELISA	99,92 %	Spécificité relative : TNV > c-ELISA >> AGID
TNV	100 %	
AGID	99,0 %	

4. La leucose bovine enzootique

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

La LBE est causée par le virus leucémogène bovin (BLV), un virus à ARN du genre Deltavirus et de la famille des Retroviridae. Ce virus possède un tropisme pour les lymphocytes B des bovins et l'infection qu'il induit persiste durant toute la vie de l'animal. La transmission du virus se fait très majoritairement par voie indirecte mécanique, à la faveur d'arthropodes hématophages ou de manière iatrogène, ce dernier mode de transmission étant prédominant.

Le virus peut toutefois dans certains cas se transmettre par contact direct avec un animal infecté ou avec ses sécrétions (ingestion de colostrum, inhalation de particules virulentes, coït). Si le BLV est rarement retrouvé dans la semence des bovins infectés il peut toutefois y être présent en association avec des lymphocytes infectés du tractus génital. Bien que parfois présent dans la semence, il n'est jamais associé aux spermatozoïdes (Choi *et al.*, 2002 ; Wrathall *et al.*, 2006). Les études tendent à montrer que le BLV n'est que rarement, si ce n'est jamais, transmis par l'insémination artificielle. Toutefois une transmission par le tractus génital est possible via la présence dans la semence de lymphocytes infectés par le BLV (Van Der Maaten et Miller, 1978 ; Wrathall *et al.*, 2006). Une semence entièrement purifiée des lymphocytes permet d'éviter toute transmission génitale du virus (Kaja et Olson, 1982).

Chez les femelles infectées, une prolifération locale de lymphocytes B peut se produire dans différents organes dont l'utérus. De plus, chez les femelles gestantes le BLV peut être transmis verticalement au veau, *in utero* ou durant le vêlage. Ainsi, environ 10 %

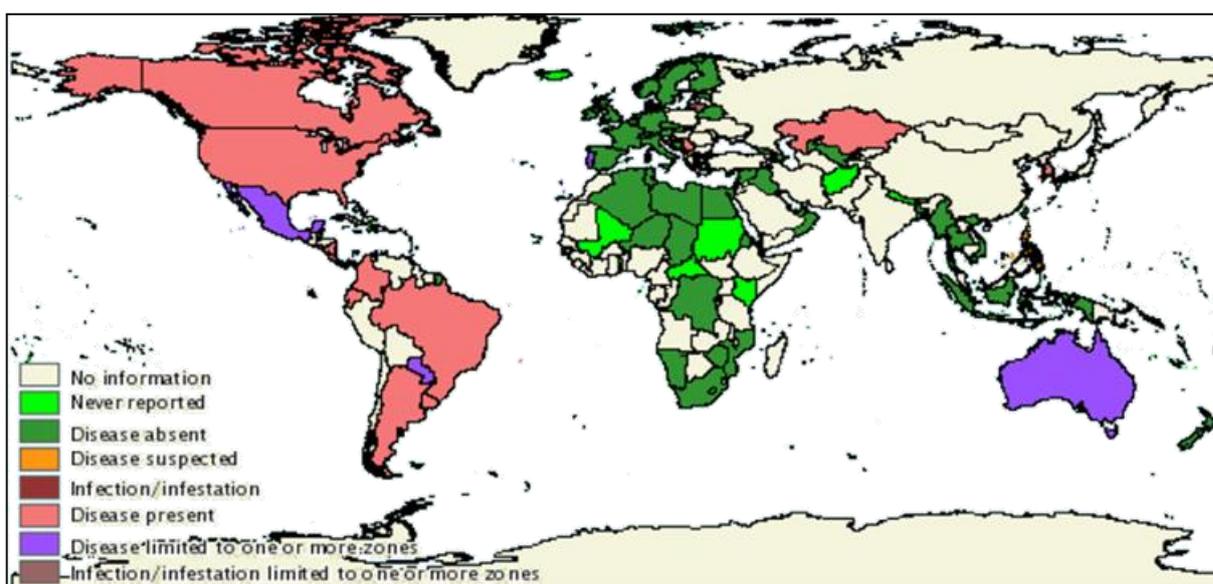
des veaux nés de mères infectées par le BLV sont eux aussi infectés à la naissance (Ruiz *et al.*, 2018).

La LBE n'est pas une maladie zoonotique.

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La LBE est une maladie mondialement répandue. Les statuts des pays sont toutefois différents, avec certains pays indemnes tandis que la maladie circule activement dans d'autres (Figure 6).

Figure 6 : Situation épidémiologique de la LBE dans le monde en janvier 2020 (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2020).



Actuellement les cas de LBE sont extrêmement rares en France, celle-ci étant en effet officiellement indemne de LBE depuis 1999, résultat des campagnes de prophylaxie fondées sur le dépistage de l'infection inapparente et l'élimination des animaux positifs. Cela implique que la prévalence est inférieure à 0,01 % sur le territoire. (Il est toutefois à noter que la LBE est enzootique sur l'Île de la Réunion) (Peroz et Ganière, 2021).

La LBE fait partie de la liste des maladies à notifier à l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b). Elle est également classée CDE dans la LSA et est en tant que telle soumise aux programmes d'éradication optionnels (Commission Européenne, 2018 ; Légifrance, 2021).

C. Diagnostic sérologique

L'infection par le virus de la LBE dure toute la vie de l'animal et donne lieu à une réponse anticorps persistante. Les anticorps peuvent être détectés pour la première fois 3 à 16

semaines après l'infection. Les anticorps d'origine maternelle peuvent mettre jusqu'à 6 ou 7 mois pour disparaître. Il n'existe aucun moyen de distinguer les anticorps transférés passivement de ceux résultant d'une infection active. L'infection active peut toutefois être confirmée par la détection du provirus de la LBE par PCR. Les anticorps passifs ont tendance à protéger les veaux contre l'infection.

Les tests sérologiques utilisés pour le diagnostic de la LBE sont les techniques ELISA ou l'immunodiffusion sur gel d'agar (AGID).

Au cours de la période *ante-partum*, les vaches peuvent avoir des anticorps sériques qui ne sont pas détectables par le test sérologique d'AGID en raison d'un déplacement des anticorps de la circulation de la mère vers son colostrum. Par conséquent, lors de l'utilisation du test AGID, un résultat négatif sur un sérum prélevé à cette période (2-6 semaines avant et 1-2 semaines après le vêlage) n'est pas conclusif et le test doit être répété (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018b).

ELISA :

Les techniques d'ELISA compétitif ou d'ELISA indirect peuvent être utilisées pour le diagnostic sérologique de la LBE.

Immunodiffusion sur gel d'agar :

Le test AGID est un test spécifique, mais peu sensible, permettant de détecter des anticorps dans des échantillons de sérum provenant d'animaux individuels. Les tests ELISA sont généralement plus sensibles.

Toutefois, l'AGID présente l'avantage d'être simple et facile à réaliser et s'est avéré très utile et efficace comme base des programmes d'éradication.

Les caractéristiques des tests sérologiques de la LBE sont présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la LBE (Miller et al., 1981 ; Mammerickx et al., 1984 ; Simard et al., 2000 ; Kale et Öztürk, 2004 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018b).

Technique	Sensibilité	Spécificité
ELISA	99,8 %	98,6 %
AGID	94,9 %	Élevée

5. Le virus Schmallenberg

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

Le virus Schmallenberg (SBV) est un virus enveloppé à ARN appartenant au genre des Orthobunyavirus affectant les bovins, ovins et caprins. Le virus peut induire chez les animaux infectés une fièvre de courte durée, de la diarrhée et une diminution de la production de lait chez les femelles en lactation. De plus, si le virus infecte une femelle

gestante il peut être responsable d'une infection du fœtus par voie transplacentaire, causant alors de la mortalité ou des malformations congénitales. Les malformations congénitales le plus souvent mises en évidence sont : une scoliose, une hydrocéphalie, une arthrogrypose, une hypoplasie du cervelet et une hypertrophie du thymus. Dans la plupart des cas où surviennent ces malformations, la mère n'a pas présenté de signe de la maladie (Kauffold *et al.*, 2021).

La transmission du virus se fait principalement de manière vectorisée par la morsure d'arthropodes du genre *Culicoides* spp. Cependant, plusieurs études ont mis en évidence la présence du virus dans la semence des taureaux infectés (Hoffmann *et al.*, 2013 ; Van Der Poel *et al.*, 2014 ; Kęsik-Maliszewska et Larska, 2016), interrogeant alors sur la possibilité de transmission vénérienne de la maladie. Il a de plus été démontré qu'une dose de semence d'un animal infecté pouvait être contaminante lorsqu'elle était expérimentalement injectée par voie sous-cutanée à un bovin (Schulz *et al.*, 2014). Toutefois, le rôle de la transmission vénérienne du SBV reste à explorer davantage (Kauffold *et al.*, 2021).

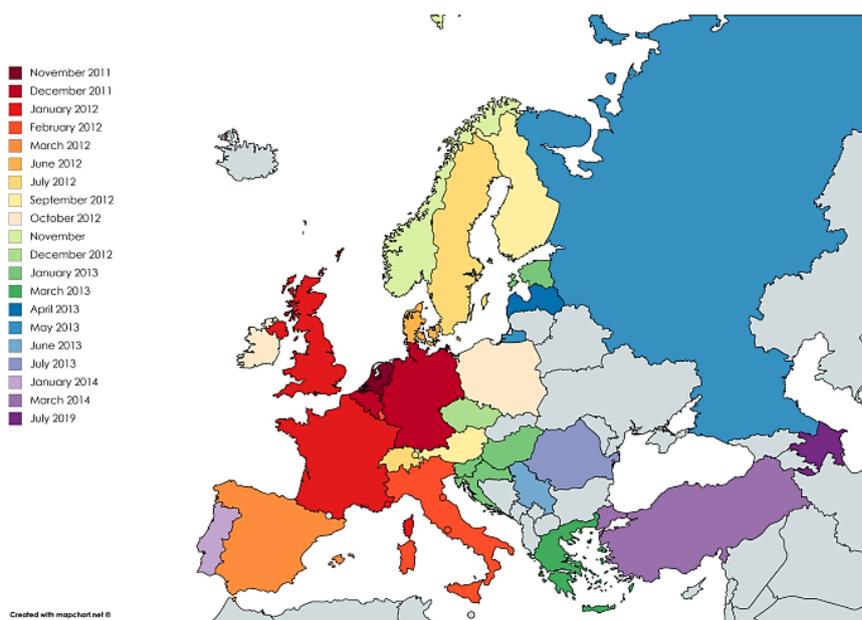
Dans la semence, le SBV peut être retrouvé dans le liquide séminal dès le début de la phase aiguë de l'infection puis il peut être associé à la fraction cellulaire séminale plusieurs semaines après la séroconversion. Le virus n'est pas associé aux spermatozoïdes (Hoffmann *et al.*, 2013).

Le virus Schmallenberg n'est pas zoonotique (European Centre for Disease Prevention and Control, 2011).

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

Le virus Schmallenberg a été détecté pour la première fois en Allemagne en 2011. Il a depuis diffusé dans de nombreux pays Européens comme le montre la Figure 7. Presque tous les pays européens sont désormais touchés. La propagation s'est de plus poursuivie en Russie et dans les pays voisins tels que l'Azerbaïdjan, la Turquie et la Chine ainsi que dans certains pays Arabes (Iran, Liban) et Africains (Mozambique, Namibie, Éthiopie). Aucun cas d'infection par le SBV n'a encore été signalé en Amérique du Nord, Amérique latine ou du Sud. Après l'exposition initiale des troupeaux, il a été démontré que le SBV est réapparu dans plusieurs pays européens, bien qu'à des niveaux inférieurs à ceux de la première épidémie. Ceci est probablement dû, au moins en partie, à la capacité du virus à surmonter les hivers (Kauffold *et al.*, 2021).

Figure 7 : Distribution du virus Schmallenberg par pays et par date de la première identification, par sérologie ou RT-qPCR (Collins et al., 2019).



En France, le virus a fortement circulé entre 2011 et 2012 lors de son introduction sur le territoire puis deux nouveaux pics de circulation virale ont été enregistrés en 2016 et 2020. Ces données seraient donc cohérentes avec une cyclicité quadriennale (à l'instar de ce qui est observé avec le virus Akabane, virus proche du SBV, présent en Océanie, Afrique et Moyen-Orient). De plus, durant la saison de surveillance 2016-2017 réalisée dans le cadre de la Plateforme d'épidémiosurveillance en santé animale, la prévalence dans les élevages bovins a été estimée à 0,045 %. Il est de plus à noter que le nombre d'élevages cliniquement atteints était trois fois supérieur sur la période 2016-2017, comparé à celui de la saison de surveillance 2015-2016, démontrant ainsi une circulation active du virus sur le territoire (Gache *et al.*, 2018 ; GDS France, 2021).

C. Diagnostic sérologique

Le diagnostic sérologique de l'infection par le SBV peut se faire par différentes techniques : test de neutralisation virale (TNV), Immunofluorescence indirecte (IFI) ou ELISA. La sensibilité et la spécificité de chacun de ces tests sont présentées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de l'infection par le virus Schmallenberg (van der Heijden et al., 2013 ; Lazutka et al., 2014 ; Wernike et al., 2017).

Technique	Sensibilité	Spécificité
TNV	94 à 100 %	99,5 %
IFI	95 %	93 %
ELISA	98,8 %	98,8 %

Parmi les différents tests, le test de neutralisation du virus semble le plus sensible et le plus spécifique (van der Poel *et al.*, 2014).

Les anticorps peuvent être détectés dans le sérum des animaux adultes infectés et dans le lait des femelles en lactation ainsi que dans différents échantillons liquides d'individus mort-nés ou nés vivants et malformés. Il est intéressant de noter que les titres d'anticorps dans le lait étaient plus élevés que dans le sérum des vaches prélevées individuellement. De plus, les titres en anticorps étaient également très prédictifs dans les échantillons de lait de tank, ce qui en fait une source de prélèvement idéale pour les programmes de surveillance (Kauffold *et al.*, 2021).

Enfin, l'infection par le virus Schmallenberg ne fait pas partie des maladies listées par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale ni des maladies catégorisées dans la LSA (Commission Européenne, 2018 ; Légifrance, 2021).

6. La dermatose nodulaire contagieuse bovine

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

Le virus de la dermatose nodulaire contagieuse bovine (VDNC) est un virus à ADN du genre Capripoxvirus (CaPV), appartenant à la famille des Poxviridae.

Celui-ci est avant tout transmis de manière vectorielle mécanique par des arthropodes hématophages, en particulier des stomoxes, parfois des moustiques ou des tiques.

Bien que plus rare, la transmission par la monte naturelle ou l'insémination artificielle serait également possible. En effet, le virus se retrouve dans les sécrétions des animaux infectés, dont la semence. Des particules virales peuvent ainsi être relarguées dans la semence même une fois les phases de virémie, séroconversion et guérison clinique passées. Le virus peut alors être identifié dans la semence durant une période pouvant aller jusqu'à 5 mois après l'infection (Irons *et al.*, 2005). De plus, une étude suggère que les testicules et l'épididyme pourraient être des sites de persistance virale, expliquant l'excrétion virale prolongée dans la semence observées chez certains taureaux infectés (Annandale *et al.*, 2010). La localisation du virus dans la semence est le liquide séminal, le virus ne présentant pas d'association avec les spermatozoïdes (Irons *et al.*, 2005). Enfin, bien que le potentiel de transmission virale par le sperme n'ait pas encore été clairement démontré,

une étude a mis en évidence que l'utilisation de semence inoculée d'une forte dose de VDNC lors d'IA résultait en une transmission du virus à la descendance (Annandale *et al.*, 2014).

Enfin, il est à noter que l'injection d'un vaccin contenant le VDNC atténué permet de prévenir l'excrétion du virus dans la semence (Osuagwuh *et al.*, 2007).

Chez les femelles contaminées, le VDNC cause l'apparition de nodules, parmi d'autres localisations, sur les muqueuses vaginales et vulvaires, d'avortement et d'infertilité (Gupta *et al.*, 2020). De plus, chez les femelles gestantes, l'infection par le VDNC peut être responsable d'une transmission intra-utérine du virus au fœtus (Rouby et Aboulsoud, 2016).

La DNCB n'est pas zoonotique.

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La DNCB, d'abord présente en Afrique, a connu une large expansion au cours des 30 dernières années. Son extension a commencé par le Moyen-Orient où elle a été notifiée pour la première fois en 1989 avant de s'y diffuser à un grand nombre de pays. Elle est ensuite apparue pour la première fois en Turquie en 2013 puis en 2015 en Grèce et en Macédoine, avant de s'étendre en 2016 à plusieurs pays des Balkans (Figure 8). Son extension de l'Afrique vers l'Europe s'est effectuée avec une grande rapidité, la vitesse moyenne de diffusion du virus étant alors de 7,6 km par semaine. La maladie a pu être éliminée d'Europe grâce à la vaccination généralisée des pays atteints et de certains pays limitrophes (Peroz et Ganière, 2021; Tuppurainen et Galon, 2016). La DNCB est ensuite apparue sur le continent asiatique, atteignant en 2019 la Chine et l'Inde, et y continue depuis son extension à d'autres pays (Cauchard *et al.*, 2020) (Figure 9).

Figure 8 : Diffusion spatiale de la dermatose nodulaire contagieuse bovine entre 2014 et 2017 en Turquie et dans les Balkans (ANDS (Animal Disease Notification System) et al., 2018).

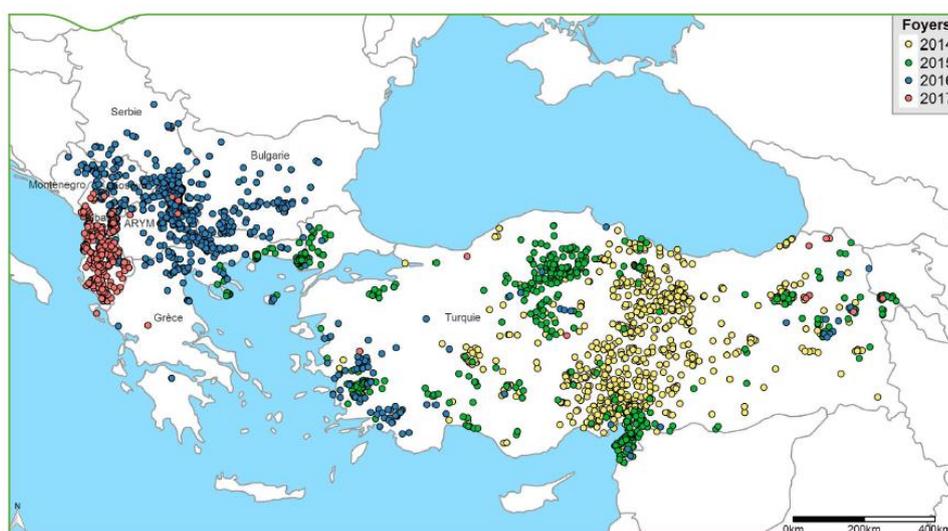
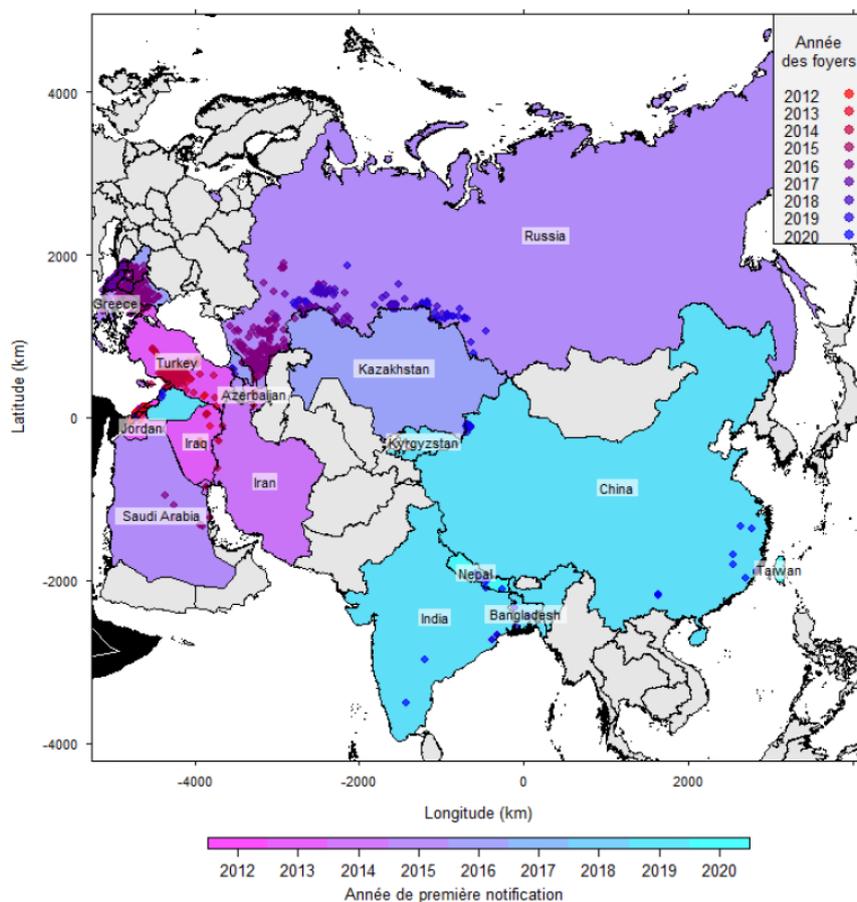


Figure 9 : Distribution de la DNCB et des foyers de la maladie notifiés par les Services Vétérinaires nationaux à l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA) dans les pays d'Eurasie d'après les données de l'OMSA) et de l'EMPRES-i (Food and Agriculture Organisation – FAO) (Cauchard *et al.*, 2020).



La DNCB n'a jamais été identifiée en France.

Du fait des pertes économiques qu'elle engendre et de sa morbidité variable mais pouvant être élevée (5 à 85 %), son importance justifie l'inscription de la DNCB à la liste des maladies à notifier à l'OMSA (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b ; Peroz et Ganière, 2021). Elle est de plus classée ADE par la LSA, elle est donc soumise à éradication immédiate en cas d'apparition sur le territoire (Commission Européenne, 2018 ; Légifrance, 2021).

C. Diagnostic sérologique

Les tests utilisés pour le diagnostic sérologique de la DNCB sont le test de neutralisation virale et la technique ELISA. Ces tests sont validés par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale.

Lorsque l'on considère le diagnostic sérologique de la DNCB il convient de noter que tous les virus du genre Capripoxvirus partagent un antigène majeur commun pour les anticorps neutralisants. Il n'est donc pas possible de distinguer les souches de capripoxvirus des

bovins, des ovins ou des caprins à l'aide de techniques sérologiques (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021d).

Test de neutralisation virale (TNV) :

Lors du TNV le sérum peut être testé de deux manières différentes : la première consiste à titrer le sérum contre un titre constant de Capripoxvirus (100 TCID₅₀, (TCID₅₀ : dose infectante pour 50 % des cellules en culture tissulaire) alors que la deuxième consiste à titrer une souche virale standard contre une dilution constante du sérum à tester de façon à calculer un index de neutralisation. Du fait de la sensibilité variable des cultures cellulaires en tissu aux Capripoxvirus, l'index de neutralisation est la méthode préférée dans la plupart des laboratoires bien qu'elle requière un plus grand volume de sérum (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021d).

Enfin, le TNV dispose d'une excellente sensibilité et spécificité pour la détection des virus du genre Capripoxvirus et apparaît donc comme la méthode de référence pour le diagnostic sérologique de ceux-ci (Milovanović *et al.*, 2019 ; Samojlović *et al.*, 2019).

ELISA :

De même que le TNV, les tests immuno-enzymatiques (ELISA) pour la détection des anticorps anti-capripoxvirus sont largement utilisés pour le diagnostic sérologique de la DNCB. Ces tests sont de plus disponibles sous forme de nombreux kits commerciaux.

Les caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la DNCB sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la DNCB (Milovanović *et al.*, 2019; Samojlović *et al.*, 2019).

Technique	Sensibilité	Spécificité
TNV	100 %	100 %
ELISA	88,2 % à 91 %	87 % à 99,2 %

D'autres tests tels que l'immunodiffusion sur gel d'agar ou l'immunofluorescence indirecte sont également disponibles pour le diagnostic sérologique de la DNCB mais ils présentent une moindre spécificité que le TNV du fait de la présence de réactions croisées avec des anticorps ciblant d'autres Poxvirus. De plus, la méthode de Western blot utilisant la réaction entre l'antigène P32 du virus de la DNCB et le sérum à tester est à la fois sensible et spécifique mais sa réalisation est difficile et coûteuse.

Ainsi, ces tests ne sont pas validés par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale et sont peu utilisés (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021d).

7. La fièvre aphteuse

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

La fièvre aphteuse est causée par un Aphotavirus (FMDV : Foot and Mouth Disease Virus), virus à ARN appartenant à la famille des Picornaviridae et affectant les ongulés. Le virus de la fièvre aphteuse présente une importante pluralité génétique avec 7 types (A, O, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3, Asia 1) et 65 sous-types. Le virus est retrouvé dans toutes les sécrétions des animaux infectés : air expiré, aphtes, salive, sang, lait, urine et sperme.

Dans la semence le virus est principalement localisé dans le liquide séminal. De manière quantitativement moins importante, il peut également avoir une localisation intracellulaire au sein des spermatozoïdes (Cottral *et al.*, 1968). Ainsi, le virus peut être transmis par voie vénérienne lors de la monte naturelle ou lors de l'IA si de la semence congelée contaminée est utilisée (Pawar *et al.*, 2010).

De plus, une transmission verticale du FMDV est possible chez les vaches en phase aiguë de l'infection, et ce à différents stades de la gestation (Ranjan et Singh, 2018).

La fièvre aphteuse est une zoonose considérée comme mineure du fait de son caractère rare et peu grave chez l'Homme. La symptomatologie chez l'Homme est identique à celle chez l'animal, avec en particulier la présence d'une fièvre d'intensité modérée et l'apparition d'une éruption cutanée localisée aux mains et aux pieds (Bauer, 1997).

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La fièvre aphteuse est une maladie animale transfrontalière grave qui impacte fortement la production de bétail et perturbe le commerce international des animaux et de leurs produits et dont la situation épidémiologique mondiale est très instable.

Selon les estimations, la maladie circulerait parmi 77 % du bétail au niveau mondial, principalement en Afrique, au Moyen-Orient et en Asie (Figure 10). D'autres pays sont indemnes, avec ou sans vaccination, mais restent sous la menace permanente d'une introduction de la maladie sur leur territoire (Figure 11).

Ainsi, depuis 2012, une stratégie mondiale de lutte contre la fièvre aphteuse a été adoptée. (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018c)

Figure 10 : Distribution mondiale des sérotypes du virus de la fièvre aphteuse entre Janvier 2012 et Janvier 2022 (Mclaws et Shankar, 2022).

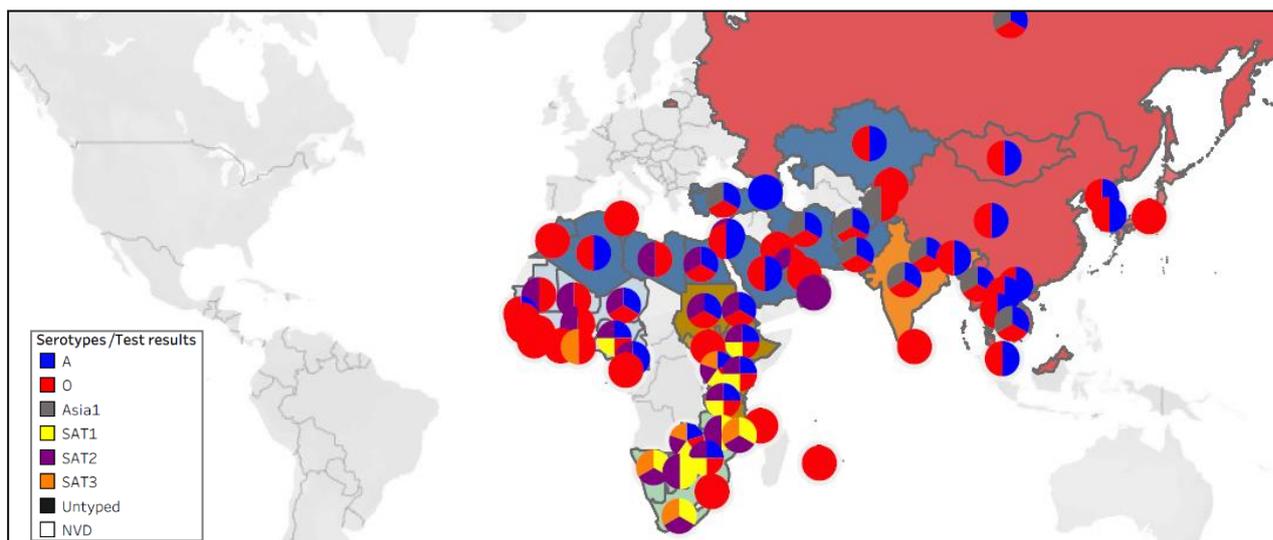
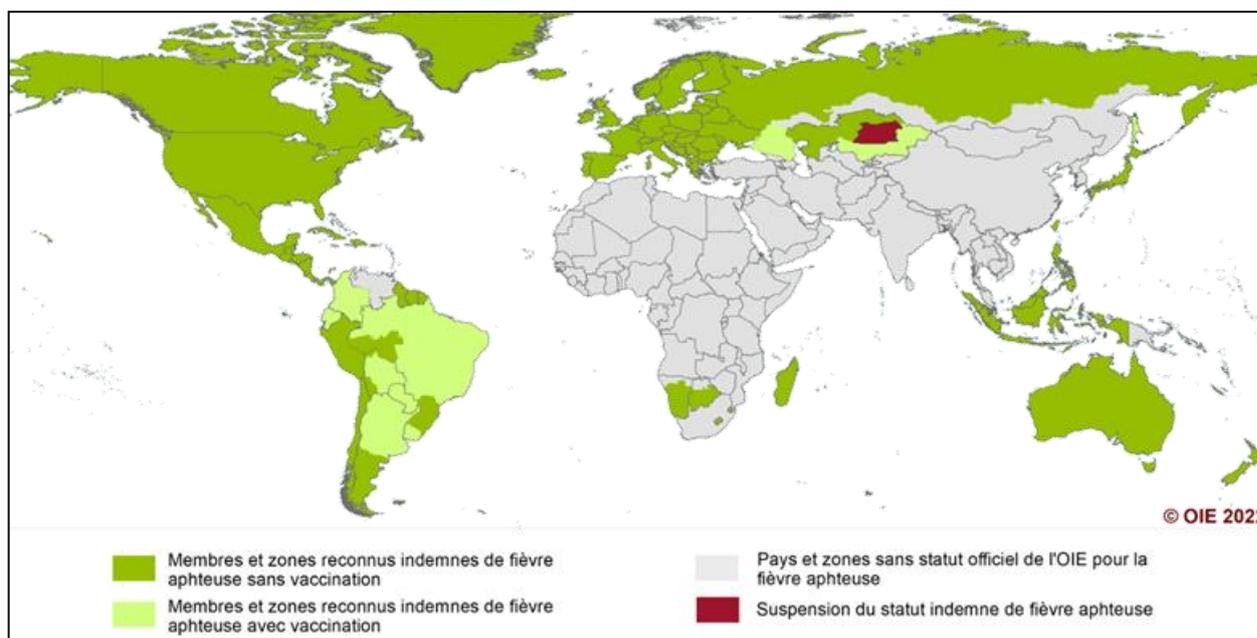


Figure 11 : Carte du statut officiel des membres de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale vis-à-vis de la fièvre aphteuse (Organisation mondiale de la santé animale, 2022a).



La France est officiellement indemne de fièvre aphteuse sans vaccination depuis 2001, conformément aux dispositions du Chapitre 8.8. du *Code terrestre* (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b).

Enfin, la maladie est classée ADE par la LSA, elle est donc soumise à éradication immédiate en cas d'apparition sur le territoire (Légifrance, 2021). La fièvre aphteuse fait de plus partie des maladies à notifier à l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b).

C. Diagnostic sérologique

Les tests sérologiques de détection de la fièvre aphteuse peuvent être réalisés dans l'un des quatre objectifs suivants : 1) certifier individuellement du statut indemne de Fièvre aphteuse des animaux avant l'importation ou l'exportation (c'est-à-dire pour le commerce) ; 2) confirmer les cas suspects de fièvre aphteuse ; 3) prouver l'absence d'infection ; 4) démontrer l'efficacité de la vaccination. Pour prouver l'absence d'infection, différentes approches sont nécessaires selon que la population a été vaccinée ou non et que, si la vaccination a été utilisée, elle a été appliquée ou non en urgence ou dans le cadre d'un programme permanent de vaccination (pour rappel cette dernière possibilité est interdite en France). Différents tests et différentes interprétations des résultats des tests seront nécessaires en fonction des objectifs mentionnés ci-dessus et du test sélectionné. Ainsi, la procédure choisie doit tenir compte de l'objectif poursuivi. Par exemple, les seuils de détection des tests peuvent être fixés à un autre niveau pour la sérosurveillance des troupeaux que pour certifier l'absence d'infection pour des animaux individuels à des fins de commerce international.

Les tests sérologiques de la fièvre aphteuse sont de deux types : ceux qui détectent les anticorps dirigés contre les protéines structurales virales (PSv) et ceux qui détectent les anticorps dirigés contre les protéines non structurales (PNS).

La mise en évidence d'anticorps spécifiques dirigés contre des protéines structurales chez des animaux non vaccinés indique une infection antérieure par le FMDV. Cette méthode est particulièrement utile dans les cas bénins ou lorsque du tissu épithélial ne peut être prélevé. La recherche d'anticorps dirigés contre certaines protéines non structurales (PNS) du virus de la Fièvre aphteuse est utile pour mettre en évidence une réplication virale antérieure ou actuelle chez l'hôte, indépendamment du statut vaccinal. Les PNS, contrairement aux protéines de structure, sont très conservées et ne sont donc pas spécifiques d'un sérotype.

Les tests ciblant les anticorps dirigés contre les PSv sont relativement spécifiques des sérotypes et détectent les anticorps induits par la vaccination et l'infection ; les exemples sont le test de neutralisation du virus, le test ELISA bloquant en phase liquide ou le test ELISA compétitif. Ces tests sont très sensibles, à condition que le virus ou l'antigène utilisé dans le test corresponde étroitement à la souche circulant sur le terrain. Ce sont les tests utilisés pour certifier les animaux avant leur déplacement, y compris à des fins de commerce international, et ils sont appropriés pour confirmer une infection antérieure ou en cours chez des animaux non vaccinés ainsi que pour contrôler l'immunité conférée par la vaccination sur le terrain.

Parmi les tests sérologiques disponibles pour la détection des anticorps contre le FMDV, les tests de neutralisation virale (TNV) et les techniques ELISA pour les anticorps contre les protéines structurales (PSv) sont ainsi utilisés comme étant spécifiques d'un sérotype. Le TNV dépend de cultures cellulaires en tissus ce qui le rend donc plus sujet à la variabilité que les tests ELISA. De plus le TNV est également plus lent et sujet à la

contamination. Les tests ELISA pour la détection des anticorps ont l'avantage d'être plus rapides et de ne pas dépendre de cultures cellulaires. Des résultats faussement négatifs dus à de faibles titres en anticorps peuvent survenir dans une petite proportion de sérums testés dans les deux techniques ELISA. A contrario, une approche combinant le dépistage par ELISA et la confirmation des positifs par le TNV minimise l'occurrence de résultats faussement positifs.

La détection d'anticorps dirigés contre les PNS du virus de la fièvre aphteuse peut être utilisée pour identifier une infection passée ou présente par l'un des sept sérotypes du virus, que l'animal ait été vacciné ou non. Ces tests peuvent donc être utilisés pour confirmer les cas suspects de fièvre aphteuse et pour évaluer la prévalence de l'infection ou pour prouver l'absence d'infection dans une population. Pour la certification des animaux destinés au commerce, ces tests présentent l'avantage, par rapport aux méthodes détectant les PSv, qu'il n'est pas nécessaire de connaître le sérotype du virus. Cependant, il existe des preuves expérimentales que certains bovins, vaccinés puis exposés au virus vivant et confirmés comme infectés de manière persistante, peuvent ne pas être détectés par certains tests anti-PNS, ce qui entraîne des résultats faussement négatifs.

Les techniques ELISA peuvent être utilisées pour la détection des anticorps dirigés contre les PNS.

Les caractéristiques des tests de sérologiques de la Fièvre aphteuse sont présentées dans le Tableau 10 ci-dessous.

Tableau 10 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la Fièvre aphteuse (Chénard et al., 2003 ; Gonzales et al., 2014 ; Morgan et al., 2014).

Technique	Sensibilité	Spécificité
TNV	88,7 % à 99,8 %	59,9 % à 81 %
PNS Ac ELISA	75 % à 87 %	93 % à 98 %
PS Ac ELISA	99 %	96 %

PNS Ac ELISA : ELISA ciblant les anticorps dirigés contre des protéines non structurales du FMDV.

PS Ac ELISA : ELISA ciblant les anticorps dirigés contre des protéines structurales du FMDV.

8. La brucellose

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

La Brucellose bovine est une maladie causée par un coccobacille Gram négatif : *Brucella abortus*. Elle peut également, de manière plus rare, être causée par *Brucella melitensis* ou *Brucella suis*. La Brucellose est par ailleurs une maladie présente chez de très nombreuses espèces de mammifères et pouvant être causée par différentes espèces de *Brucella*.

La Brucellose peut être transmise de manière horizontale ou verticale. Le mode de contamination le plus fréquent est la voie horizontale par ingestion d'aliments et d'eau contaminés ou par contact avec des fœtus avortés, des membranes fœtales ou des écoulements utérins de femelles contaminées. L'inhalation peut également être un mode de transmission. Toutefois, une contamination par voie vénérienne est également possible, les taureaux infectés pouvant en effet transmettre l'infection lors de la saillie ou de l'insémination artificielle. Cette transmission s'explique par la présence de la bactérie dans le tractus génital et la semence des taureaux infectés (Khurana *et al.*, 2021). Ainsi, chez les taureaux infectés, un nombre important de bactéries sont excrétées dans la semence précocement durant la phase aiguë de l'infection. L'excrétion diminue ensuite progressivement au cours de la phase chronique. Enfin, l'excrétion bactérienne peut se poursuivre pendant de nombreuses années, de façon intermittente ou régulière (Acha et Szyfers, 2001).

Le mécanisme exact de liaison de la bactérie aux spermatozoïdes est encore mal connu chez les bovins. Les études menées chez d'autres espèces peuvent toutefois fournir des pistes pour expliquer le mécanisme d'association du pathogène aux spermatozoïdes. Ainsi, chez les béliers infectés par *Brucella ovis* les bactéries se fixent au niveau de la tête des spermatozoïdes entraînant ainsi une rupture de la membrane plasmique, la séparation de l'acrosome et de la *galea capitis* et le gonflement de la membrane nucléaire puis la sortie de matériel génétique du noyau (Bakurdzhiev, 1977). Chez les chiens infectés par la brucellose, la présence de *Brucella canis* dans la semence induit de plus l'agrégation des spermatozoïdes par leurs têtes, dû à la production d'autoanticorps anti-spermatozoïdes chez les chiens infectés (Serikawa *et al.*, 1984).

L'infection d'une femelle gestante peut être responsable d'avortement, généralement au cours de la seconde moitié de la gestation, de mortinatalité ou de la naissance de veaux faibles. De plus la Brucellose peut causer chez les femelles gestantes des métrites et des rétentions placentaires. La transmission verticale de la bactérie peut avoir lieu et cause alors la naissance d'un veau infecté. L'infection d'une femelle non gestante est le plus souvent asymptomatique.

Enfin, dans de nombreux cas, les bovins restent infectés pendant des années ou à vie par *B. abortus*. De plus, lors de ces infections chroniques les femelles peuvent excréter la bactérie lorsqu'elles avortent. Une réinvasion de l'utérus par la bactérie lors des

gestations suivantes est également possible bien qu'elle ne provoque que rarement un autre avortement (Khurana *et al.*, 2021).

Enfin, la Brucellose est une maladie zoonotique d'importance majeure. La principale source de contamination par *Brucella abortus* pour l'Homme est la consommation de lait cru ou de produits laitiers confectionnés avec du lait cru provenant d'animaux infectés. La Brucellose est de plus considérée comme une maladie professionnelle chez certaines catégories de travailleurs comme les éleveurs de vaches laitières, le personnel des entreprises agroalimentaires laitières et des abattoirs, les bouchers, les bergers, le personnel de laboratoire, les assistants vétérinaires et les vétérinaires. Chez ces catégories professionnelles l'infection peut se produire par le biais de lésions de la peau ou par inhalation.

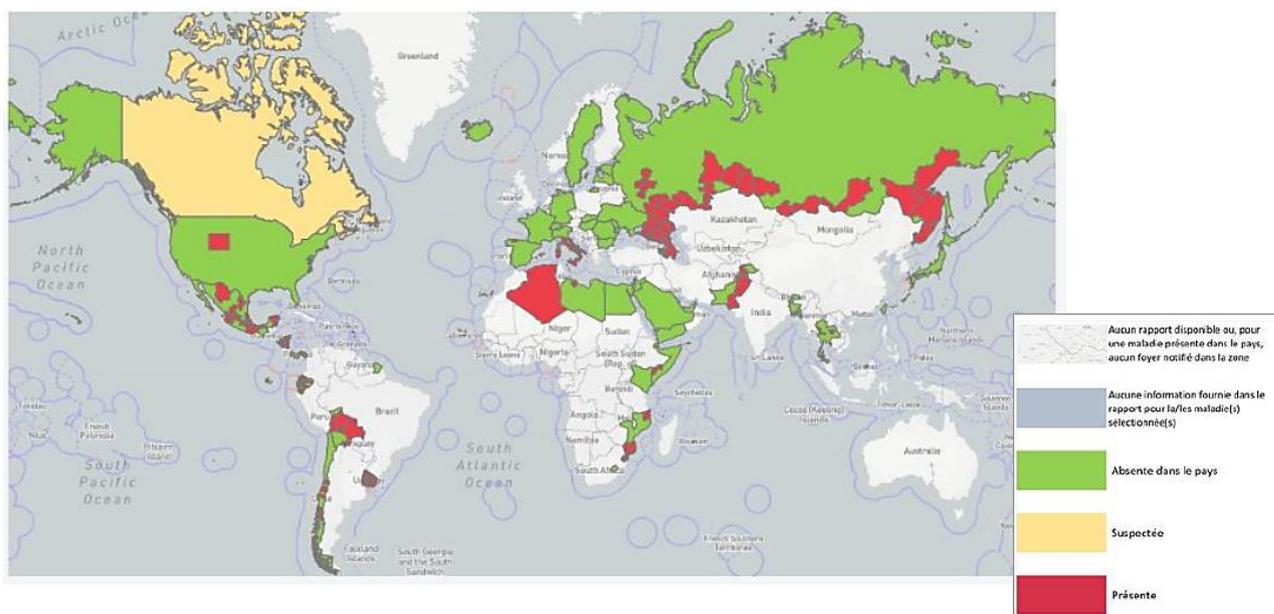
Chez l'Homme, la Brucellose cause généralement une fièvre ondulante pouvant être associée selon les sites de l'infection à : une encéphalite, une méningite, une spondylite, une arthrite, une orchite, une épидидymite, une prostatite ou une endocardite. De plus, la brucellose humaine s'accompagne de complications telles que l'arthrite, l'ostéomyélite, la bursite, la discite et la ténosynovite chez 10 à 85 % des patients. Enfin, la Brucellose peut être responsable d'avortement chez la femme enceinte au cours du premier ou second trimestre de grossesse (Khurana *et al.*, 2021).

L'impact de la Brucellose en santé humaine est donc très important, tant par la gravité de la maladie que par son incidence. En effet, la Brucellose est actuellement considérée comme une des zoonoses réémergentes les plus répandues dans le monde, avec une incidence estimée à plus de 50 000 cas humains par an (Gwida *et al.*, 2010).

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La Brucellose bovine est une maladie sévissant mondialement. L'incidence la plus élevée est constatée au Moyen-Orient, dans la région de la Méditerranée, en Afrique subsaharienne, en Chine, en Inde, au Pérou et au Mexique. Actuellement, les pays d'Asie centrale et d'Asie du Sud-Est enregistrent la plus forte augmentation du nombre de cas. Plusieurs pays d'Europe occidentale et septentrionale, le Canada, le Japon, l'Australie et la Nouvelle-Zélande semblent quant à eux être indemnes de l'agent causal (Organisation mondiale de la santé animale, 2022). La situation épidémiologique mondiale pour *B. abortus* est présentée sur la Figure 12.

Figure 12 : Répartition dans le monde de *Brucella abortus* entre 2020 et 2022 (Organisation mondiale de la santé animale, 2022b).



La France est reconnue pays officiellement indemne depuis 2005 et possède depuis 2021 le statut « indemne d'infection à *Brucella abortus*, *B. melitensis* et *B. suis* » chez les populations d'animaux de l'espèce bovine. L'acquisition de ce statut a été rendue possible par les campagnes de prophylaxie, rendues obligatoires à partir de 1975, qui ont permis de passer d'une situation où plus de la moitié des élevages étaient atteints par le Brucellose à un taux de prévalence inférieur à 0,01 % des élevages depuis 2001.

Cependant, quatre foyers ont toutefois été découverts au cours de la dernière décennie. Le premier a été découvert en 2012 dans le Pas-de-Calais et était un cas d'infection par *B. abortus* biovar 3 chez une vache non gestante provenant d'une exploitation Belge reconnue comme infectée. Le second, également en 2012, était un foyer dans un élevage de Haute-Savoie. Plusieurs vaches y ont été reconnues infectées à *B. melitensis* biovar 3 par PCR. La contamination des vaches avait eu lieu par des bouquetins du massif du Bargy, chez qui le pathogène est présent. Ce foyer a donné lieu à plusieurs cas humains par consommation de fromages au lait cru produits dans l'élevage. Un cas d'infection par *B. suis* biovar 2 avait également été détecté en 2014 en Vendée. Enfin, le dernier cas de brucellose bovine date de 2021 et a été découvert dans une exploitation de Haute-Savoie dans le cadre de la surveillance sanitaire régulière des élevages. Les enquêtes épidémiologiques réalisées ont révélé que la contamination avait également été causée par des bouquetins. La surveillance renforcée dans la région avait cependant permis d'éviter des cas humains. Toutefois, considérés comme maîtrisés, ces événements n'ont pas entraîné la perte de la qualification indemne de la France (Ganière et Laaberki, 2021).

Enfin, l'importance économique et sanitaire de la Brucellose bovine justifie son classement comme maladie à éradication obligatoire au sein de l'Union Européenne (catégorie BDE) et la mise en œuvre d'une prophylaxie nationale obligatoire. Elle fait

également partie des maladies listées par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale. Elle est de plus considérée comme un vice rédhibitoire (Commission Européenne, 2018 ; Légifrance, 2021).

C. Diagnostic sérologique

Les tests sérologiques sont importants pour les programmes de suivi, de surveillance, de contrôle et d'éradication de la Brucellose dans le monde entier. À ce titre, les tests sérologiques fréquemment employés sont : le Test sur plaque de Rose Bengale (TPRB), le test d'agglutination standard en tube (SAT), le test de fixation du complément (FC) et le test par méthode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Enfin, l'utilisation du test à flux latéral (LFA) s'est développée au cours des dernières années (Khurana *et al.*, 2021).

Test sur plaque de Rose Bengale ou Épreuve à l'antigène tamponné (EAT) :

Il s'agit d'une méthode rapide, sensible et spécifique de détection des IgG anti-*Brucella* dans le sérum. Le TPRB peut de plus être utilisé pour la confirmation rapide de certaines formes de Brucellose : brucellose neurologique, arthrite, épидидymite, orchite et hydrocèle (Mantur *et al.*, 2006).

Test de fixation du complément :

Le test de fixation du complément permet de détecter les IgM et IgG1 dirigés contre *Brucella*. Il s'agit d'un test très spécifique. Cependant, la présence d'IgG2 peut empêcher la fixation du complément et induire un résultat faussement négatif. Cela explique sa moindre sensibilité par rapport à d'autres méthodes.

Test d'agglutination standard en tube :

Le test d'agglutination en tube permet la détection des IgM et IgG anti-brucellose. La détection des IgG en particulier en fait un excellent indicateur de Brucellose active. Les limites de ce test sont les potentielles réactions croisées avec les IgM contre *Escherichia coli* O116 et O157, *Salmonella* Urbana, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Afipia clevelandensis* et d'autres bactéries. De plus, une absence de séroconversion durant la phase précoce de l'infection peut être due à la présence d'anticorps bloquants. De telles limitations peuvent toutefois être évitées par des modifications telles que l'ajout de globuline, d'EDTA ou de 2-mercaptoéthanol (Khurana *et al.*, 2021).

Test ELISA :

Le test ELISA permet de détecter les IgG et IgM dirigés contre *Brucella*. De plus, le test ELISA peut être réalisé de manière indirecte (iELISA) ou de manière compétitive (cELISA). Les deux méthodes possèdent une excellente sensibilité et spécificité.

Test à flux latéral :

Le LFA est un test qui a été développé au cours des dernières années. Il présente la caractéristique d'être facile et rapide d'emploi tout en conservant une sensibilité et une spécificité satisfaisantes.

Les valeurs de sensibilité et de spécificité de chacun des tests décrits ci-dessus sont présentés dans le Tableau 11.

Les tests sérologiques approuvés dans l'Union Européenne sont fixés par la Directive 64/432/EEC et sont : le test de fixation du complément, les méthodes ELISA indirect et compétitive, l'épreuve à l'antigène tamponné et les tests d'agglutination standard en tube ou modifié avec EDTA.

Enfin, un élément à prendre en compte lors de l'interprétation des résultats des analyses sérologiques est le délai d'apparition des anticorps dans le sang. Dans le cas de la Brucellose, les anticorps commencent à apparaître dans le sang environ une semaine après l'infection par *Brucella*.

Tableau 11 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la Brucellose (Abernethy et al., 2012 ; Khurana et al., 2021).

Technique	Sensibilité	Spécificité
EAT	99,3 %	100 %
FC	93 %	100 %
SAT	99,4 %	99,6 %
ELISA	94,2 %	99,7 %
LFA	89,1 %	98,2 %

9. La tuberculose

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

La Tuberculose bovine est une maladie contagieuse d'évolution chronique causée par la mycobactérie *Mycobacterium bovis* ou plus rarement par *Mycobacterium tuberculosis*. Les bovins peuvent également être infectés par *M. avium*, cependant cette mycobactérie est généralement responsable d'infections bénignes, spontanément curables, dont l'importance est surtout liée aux conséquences pour le dépistage allergique de la Tuberculose bovine. La Tuberculose est une maladie pouvant affecter un grand nombre d'espèces, en effet, toutes les espèces domestiques et sauvages d'animaux vertébrés peuvent être infectées par des bacilles tuberculeux.

La Tuberculose bovine peut être transmise par inhalation, par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés ou par voie génitale. La mycobactérie se retrouve en effet dans différents fluides corporels selon la localisation de l'infection, tels que le jetage, le lait, l'urine et la semence. Dans le tractus génital mâle la mycobactérie peut se localiser en particulier au niveau de l'épididyme et de la vésicule séminale, rendant alors le sperme contaminé. De plus, l'infection du tractus génital est responsable d'une diminution de la fertilité, voire d'une infertilité, chez les mâles infectés. Cela résulte tout d'abord de l'épididymite et de la destruction et la fibrose de l'épididyme qu'induit la Tuberculose lorsqu'elle atteint le tractus génital. De plus, la mycobactérie peut également induire une diminution de la qualité de la

semence, sans pour autant diminuer le nombre de spermatozoïdes (Tzvetkov et Tzvetkova, 2006).

La transmission génitale de la maladie peut causer chez les femelles une endométrite tuberculeuse (Domingo *et al.*, 2014).

Enfin, une contamination du fœtus par voie transplacentaire est possible chez les femelles gestantes infectées. Les veaux nés avec une infection congénitale développent généralement une tuberculose généralisée au cours des premières semaines ou des premiers mois de leur vie. (Domingo *et al.*, 2014 ; Givens, 2021).

La Tuberculose est une zoonose. En effet, toutes les espèces domestiques et sauvages d'animaux vertébrés peuvent être infectées par des bacilles tuberculeux. La contamination humaine s'effectue essentiellement par voie aérienne à partir des animaux infectés, par consommation de lait cru et par contact direct entre la peau humaine lésée et des tissus animaux infectés. Toutefois, la Tuberculose d'origine bovine est actuellement rare chez l'Homme dans les pays industrialisés.

La Tuberculose est une maladie d'évolution chronique et insidieuse. En règle générale, l'hypertrophie des nœuds lymphatiques constitue le seul symptôme de la maladie mais dans les stades plus avancés, l'atteinte, quand elle se manifeste, est majoritairement localisée à l'appareil respiratoire, bien que de multiples autres organes puissent être affectés. En l'absence de traitement la maladie peut évoluer vers la mort.

Ainsi, la Tuberculose demeure une zoonose majeure par sa gravité, bien que le nombre de cas de tuberculose humaine d'origine zoonotique soit faible en France (Crozet *et al.*, 2021).

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

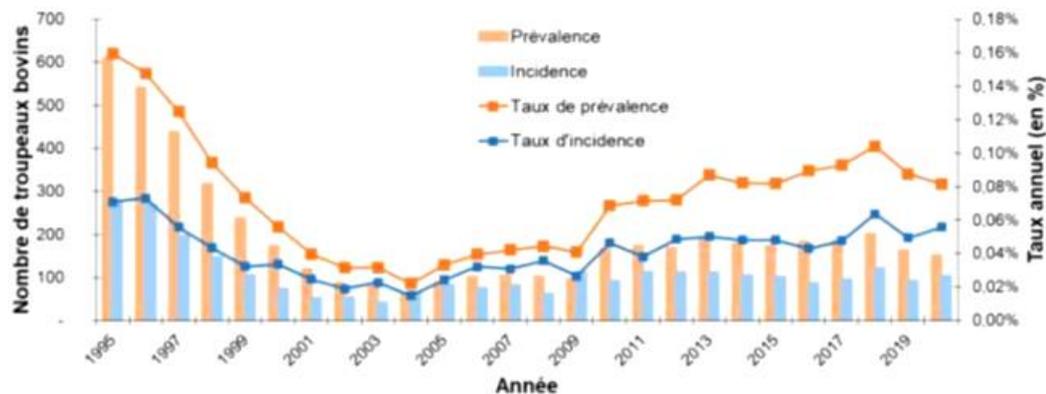
La Tuberculose bovine est présente dans toutes les régions du monde avec toutefois des fréquences variables selon les zones. Ainsi, elle est devenue rare dans la plupart des pays d'Europe Occidentale et d'Amérique du Nord tandis qu'elle est fréquente dans certains pays d'Amérique du Sud, d'Afrique et d'Asie.

Au sein de l'Union Européenne, 18 pays présentent un taux de prévalence annuelle de troupeaux infectés inférieur à 0,1 % depuis au moins six ans et ont ainsi le statut officiellement indemne, il s'agit de : l'Allemagne, l'Autriche, la Belgique, le Danemark, l'Estonie, la Finlande, la France, la Lettonie, la Lituanie, le Luxembourg, la Hongrie, Malte, les Pays-Bas, la Pologne, la République Tchèque, la Slovaquie, la Slovénie, et la Suède. L'Italie, le Portugal et l'Espagne sont quant à eux indemnes dans certaines régions seulement.

En France, la Tuberculose a été la maladie à l'origine de la création des groupements de défense sanitaire en 1954. En effet, à l'époque plus de 25 % des élevages bovins étaient infectés de Tuberculose, ce qui engendrait des pertes économiques conséquentes et engendrait un risque très élevé pour la santé humaine. Les mesures de prophylaxie sanitaire, rendues obligatoires à partir de 1965, ont permis une diminution continue du taux de prévalence, jusqu'à passer sous le seuil de 0,1 % d'élevage infectés en 1994 et

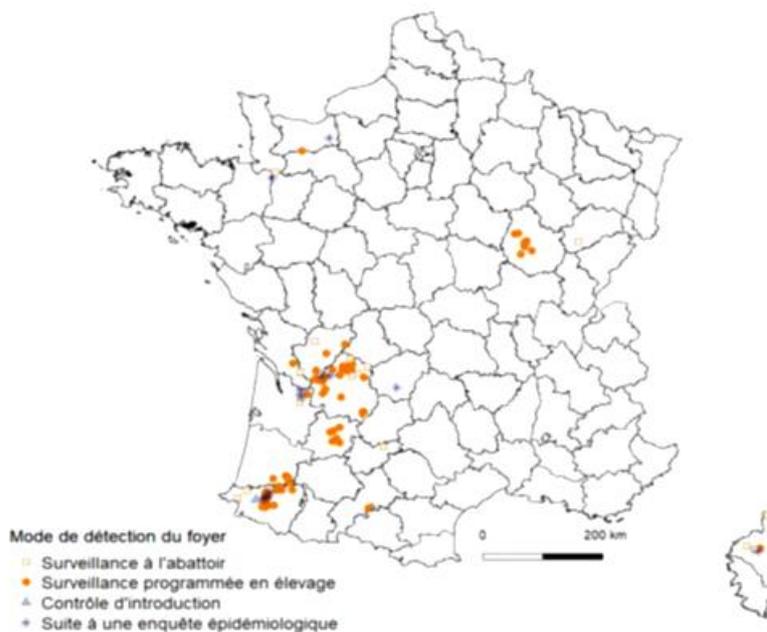
l'obtention du statut officiellement indemne en 2001. Cependant, depuis 2005, une recrudescence est notée, le taux d'incidence ayant même atteint 0,089 % en 2014, faisant alors craindre une perte du statut officiellement indemne de la France (Figure 13).

Figure 13 : Évolution des pourcentages de prévalence et d'incidence annuelles des élevages infectés de Tuberculose bovine en France de 1995 à 2020 (Plateforme ESA, 2021).



Les foyers incidents depuis 2012 sont principalement localisés en Côte-d'Or, Dordogne, Pyrénées-Atlantiques et Haute-Corse (Figure 14).

Figure 14 : Carte des foyers bovins déclarés infectés de tuberculose en 2020 (ANSES, 2021).



Enfin, dans les zones d'incidence de la Tuberculose bovine, la présence de l'infection par *M. bovis* a été mise en évidence dans la faune sauvage, chez des cervidés, des blaireaux et des sangliers en particulier, et pourrait agir comme un réservoir pour la recontamination des élevages bovins dans ces zones (Crozet *et al.*, 2021).

Les pertes économiques et les risques pour la santé humaine qu'induit la Tuberculose expliquent que celle-ci soit classée comme une maladie à éradication, surveillance et notification obligatoire (catégorie BDE) par la Commission Européenne et qu'une prophylaxie nationale obligatoire soit mise en place. De plus, toutes les espèces domestiques et sauvages d'animaux vertébrés pouvant être infectées par des bacilles tuberculeux, cela justifie que la Tuberculose soit une maladie réglementée chez toutes les espèces de mammifères, lorsqu'elle est due à *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium caprae* (Catégorie BDE chez les bovidés, D et E chez les autres artiodactyles et E chez les autres mammifères terrestres.). La Tuberculose fait de plus partie des maladies à déclaration obligatoire à l'Organisation Mondiale de la Santé Animale. (Commission Européenne, 2018 ; Légifrance, 2021).

C. Diagnostic sérologique

Des tests sérologiques existent mais aucun n'est reconnu par la Commission Européenne pour le dépistage de la Tuberculose bovine. En effet, les réponses immunitaires très variables observées entre les individus face aux antigènes mycobactériens et la variation antigénique entre les souches mycobactériennes rendent difficile l'obtention de résultats sérologiques fiables. De plus, la sensibilité des tests sérologiques dirigés contre la Tuberculose est limitée en raison du développement tardif et irrégulier de la réponse immunitaire humorale chez les bovins au cours de la maladie.

Finalement, en France, les tests sérologiques ne sont pas utilisés pour le dépistage de la Tuberculose (Ramos *et al.*, 2015 ; Crozet *et al.*, 2021).

10. La Trichomonose

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

La Trichomonose est une maladie causée par un protozoaire flagellé, *Tritrichomonas foetus*, pathogène du tractus génital des bovins. La Trichomonose est asymptomatique chez les taureaux infectés. Cependant, sa transmission vénérienne peut entraîner chez les femelles contaminées une vaginite, une cervicite, une endométrite, de l'infertilité, un retour tardif en chaleurs, une mort embryonnaire précoce et, rarement, un avortement. L'infection de l'appareil reproducteur femelle entraîne généralement une forte réponse immunitaire humorale qui permet l'élimination de l'infection dans les 90 jours.

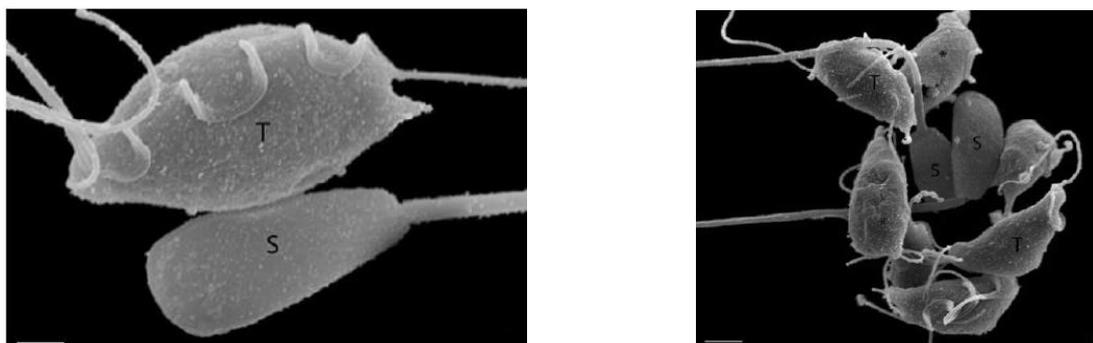
De plus, la transmission vénérienne de cette maladie est à risque tant en monte naturelle que lors d'IA car le pathogène a démontré sa capacité à survivre dans la semence congelée (Givens, 2018).

Chez les taureaux infectés, *Tritrichomonas foetus* réside dans les cryptes épithéliales du prépuce. Une infection à vie peut alors se mettre en place. De plus, bien que le pathogène soit généralement associé au gland du pénis et au prépuce proximal, la semence peut être contaminée pendant la collecte.

Lorsque le pathogène est présent dans la semence il adhère aux spermatozoïdes et cause une diminution de leur motilité, l'agglutination des spermatozoïdes et leur phagocytose (Benchimol *et al.*, 2008 ; Givens, 2018). Les dommages causés aux spermatozoïdes par *Tritrichomonas foetus* sont dus à un contact étroit entre les deux cellules. En effet, lorsque le parasite est présent dans la semence il établit un contact extracellulaire étroit avec les spermatozoïdes, aussi bien au niveau de la tête que du flagelle (cf figure 15). De plus, l'adhérence ainsi formée est forte car même lors de lavages successifs et d'un séchage turbulent celle-ci n'est pas rompue. La force de cette liaison résulte probablement de l'implication des flagelles des *Tritrichomonas* et de leurs glycoprotéines de surface pour former cette adhérence. De plus, dans certains cas, cette adhérence peut conduire à la phagocytose des spermatozoïdes. Celle-ci commence alors par contact étroit de membrane à membrane entre *Tritrichomonas foetus* et le spermatozoïde qui est ensuite suivi de l'incorporation du spermatozoïde dans une vacuole intracellulaire. Par la suite, le spermatozoïde est progressivement digéré dans les lysosomes. Ainsi, ces mécanismes causent une diminution de la motilité et de la viabilité des spermatozoïdes. En effet, alors qu'une dose de semence congelée et indemne du parasite contient encore 25 % de spermatozoïdes vivants deux heures après décongélation, elle n'en contient plus que 2 % lorsque le parasite est présent (Benchimol *et al.*, 2008).

Enfin, lorsque *T. foetus* infecte le tractus génital femelle il se fixe aux cellules épithéliales vaginales et utérines des bovins et les endommage, inhibe les divisions des cellules hôtes, provoque une inflammation de l'utérus et des trompes utérines, et endommage les ovocytes (Benchimol *et al.*, 2008).

Figure 15 : Adhérences entre *Tritrichomonas foetus* et des spermatozoïdes, vues au microscopique électronique à balayage (Benchimol *et al.*, 2008).



Légende :

T : *T. foetus*. S : spermatozoïdes. Barre d'échelle : 1 µm.

Enfin, la Trichomonose n'est pas une zoonose

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La Tritrichomonose a été identifiée pour la première fois en 1988 en France. Depuis, sa présence a été mise en évidence dans de nombreux pays autour du monde. Toutefois, bien que la maladie soit largement répandue à travers le monde, sa prévalence varie fortement selon les pays et les régions. En effet, celle-ci dépend notamment fortement du type de reproduction utilisé. En effet, bien que le parasite puisse être transmis par IA, l'utilisation de celle-ci limite sa transmission, la prévalence de la maladie est ainsi bien plus élevée dans les cheptels où la monte naturelle est majoritaire, en comparaison de ceux qui ont principalement recours à l'IA (Eaglesome et Garcia, 1997 ; Collantes-Fernández *et al.*, 2019).

En France, l'absence de campagne de prophylaxie et de dépistage systématique (hormis chez les reproducteurs en station) et le caractère asymptomatique de l'infection chez les mâles rendent difficile l'estimation de la prévalence.

Enfin, la Trichomonose est une maladie classée DE par la Loi Santé Animale (LSA) européenne, elle est donc soumise à des restrictions aux échanges et à une surveillance obligatoire et doit être déclarée à l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (Commission Européenne, 2018 ; Légifrance, 2021)

C. Diagnostic sérologique

Il n'existe pas de test sérologique disponible pour la Trichomonose. La détection de l'agent pathogène se réalise uniquement par recherche directe de celui-ci sur un frottis préputial (Rae et Crews, 2006 ; Ondrak, 2016).

11. Campylobactériose bovine génitale

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

Les bovins peuvent être infectés par *Campylobacter fetus* var. *venerealis*, une bactérie Gram-négatif appartenant à la famille des *Campylobacteraceae* et à la classe des *Epsilonbacteria* pouvant être à l'origine de la Campylobactériose génitale bovine (CGB). La CGB est généralement responsable d'une infection asymptomatique chez les mâles tandis qu'elle induit chez les femelles des vaginites, endométrites et salpingites. Elle est également une cause de mortalité embryonnaire, fœtale et d'infertilité chez les femelles infectées (Eaglesome et Garcia, 1997 ; Gilbert, 2017 ; Givens, 2018).

C. fetus venerealis est un pathogène obligatoire du tractus génital des bovins. La bactérie réside en particulier dans les cryptes épithéliales du prépuce des taureaux. Elle induit alors une infection chronique qui est à l'origine de la contamination de la semence. La maladie se transmet par voie vénérienne et en particulier par la monte naturelle. Bien que

la transmission soit également possible lors d'IA, celle-ci est très rare du fait des traitements antibiotiques contenus dans les doses de semence (Gilbert, 2017).

Lorsque la bactérie est présente dans la semence elle peut infecter différents composants de celle-ci comme le liquide séminal ou les leucocytes ou encore adhérer aux spermatozoïdes. Dans ce cas, la bactérie extracellulaire forme une adhérence de membrane à membrane avec les spermatozoïdes. Cette liaison peut avoir lieu aussi bien au niveau de la tête que du flagelle des spermatozoïdes. L'adhérence de la bactérie aux spermatozoïdes est responsable d'une diminution de leur motilité. Cependant, il n'y a pas d'information documentée sur l'effet de *Campylobacter* sur la viabilité des spermatozoïdes et il n'existe pas de consensus sur le rôle néfaste potentiel de la présence de *C. foetus venerealis* dans le sperme (Chiapparrone *et al.*, 2016).

Campylobacter fetus venerealis est très rarement à l'origine d'une zoonose. Il peut toutefois, dans de rares cas, être à l'origine d'un sepsis chez des individus immunodéficients (Fitzgerald, 2015).

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La Campylobactériose génitale bovine est une maladie largement répandue à travers le monde. Néanmoins, la maladie est devenue rare dans les régions où l'IA et la vaccination sont utilisées. Elle reste cependant une cause de pertes économiques importante dans certains pays, en particulier des pays en voie de développement (Eaglesome et Garcia, 1997 ; Givens, 2018).

En France, les études les plus récentes décrivent la maladie comme non présente dans le pays, c'est-à-dire qu'elle n'est pas enzootique dans tout ou partie du territoire, et elle affecterait ainsi moins de 10 % des cheptels. De plus, la situation est stable (ANSES, 2012).

Enfin, la Campylobactériose génitale bovine est une maladie classée DE par la Loi Santé Animale (LSA) européenne, elle est donc soumise à des restrictions aux échanges et à une surveillance obligatoire. De plus, elle fait partie des maladies listées par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (Légifrance, 2021).

C. Diagnostic sérologique

Aucun test sérologique n'est disponible pour dépister la Campylobactériose génitale chez les taureaux. Toutefois, un test existe pour les femelles. Ainsi, un test ELISA est disponible pour détecter les IgA spécifiques de *C. fetus venerealis* dans le mucus vaginal suite à un avortement. Ces anticorps demeurent en effet plusieurs mois dans le mucus vaginal et leur taux reste constant. La spécificité de ce test a été évaluée à 98,5 % mais sa sensibilité n'a pas pu être déterminée. Par conséquent ce test n'est actuellement pas considéré comme valide (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021e).

12. La fièvre Q

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

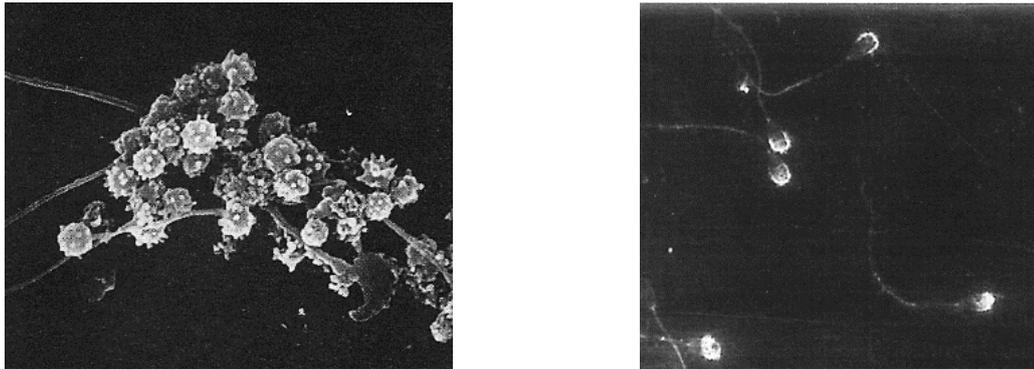
La Fièvre Q est une maladie causée par *Coxiella burnetii*, une bactérie Gram-négatif intracellulaire obligatoire, appartenant à l'ordre des Legionellales. Elle peut affecter de nombreuses espèces, dont les ruminants mais aussi les carnivores. L'infection chez les bovins est généralement asymptomatique mais elle peut causer des avortements tardifs, une mortalité ou la mise au monde d'une progéniture faible (Marrie, 1990 ; El-Mahallawy *et al.*, 2015).

La transmission de la fièvre Q entre bovins a généralement lieu par inhalation mais peut également se faire par contact avec les fluides corporels d'un animal infecté (lait, colostrum, produits d'avortement, urine, sperme), par piqure de tique ou encore via l'environnement où la bactérie est très résistante (Marrie, 1990).

De plus, la présence de la bactérie dans le sperme des taureaux séropositifs rend la maladie transmissible par voie vénérienne (Kruszewska et Tylewska-Wierzbanska, 1997). Dans la semence, *Coxiella burnetii* est liée à la surface des spermatozoïdes, principalement au niveau de leur tête (cf figure 16), suggérant une liaison spécifique (Kruszewska et Tylewska-Wierzbanska, 1993, 1997). Les spermatozoïdes recouverts de bactéries forment des agglomérats pontés par les agglutinats de bactéries. Les spermatozoïdes ne présentent par ailleurs pas de changements morphologiques. La transmission de la maladie par la semence est possible même lors de recours à l'insémination artificielle (Kruszewska et Tylewska-Wierzbanska, 1997).

Enfin, en plus de causer la transmission de la maladie par voie vénérienne aux femelles, la présence de la bactérie dans la semence pourrait également être responsable de l'infection des embryons et de la descendance. En effet, chez des embryons produits *in vitro* avec des spermatozoïdes de taureaux infectés il a été montré que *C. burnetii* adhère et pénètre dans les cellules embryonnaires et la zone pellucide. De plus, la bactérie était toujours présente à l'issue du protocole de lavage des embryons recommandé par la Société Internationale de Transfert d'Embryons, faisant alors du transfert d'embryons contaminés un mode de transmission potentiel de la bactérie de vaches donneuses infectées à des receveuses saines et à leur progéniture. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si le traitement enzymatique ou antibiotique des embryons bovins infectés par *C. burnetii* permet d'éliminer la bactérie et de vérifier si des résultats similaires sont obtenus avec des embryons *in vivo* (Alsaleh *et al.*, 2014).

Figure 16 : Adhérence de *Coxiella burnetii* à la surface des spermatozoïdes, vue au microscope électronique (Kruszewska et Tylewska-Wierzbanska, 1993, 1997).



(a) : Vue au microscope électronique à balayage de têtes de spermatozoïdes liés à *C. burnetii* (grossissement x 1200). (b) : Immunofluorescence indirecte de sperme de taureau. Les spermatozoïdes ont été incubés avec du sérum de lapin immunisé contre *C. burnetii*, suivi par du sérum contenant des immunoglobulines conjuguées au fluorochrome FITC.

La fièvre Q est une zoonose. La transmission à l'Homme se fait le plus souvent par des aérosols produits lors de la parturition ou l'avortement de femelles infectées. De plus, ces particules peuvent diffuser sur de grandes distances et l'Homme étant très réceptif à *C. burnetii*, un faible nombre de bactéries est suffisant pour l'infecter. L'infection est le plus souvent une maladie professionnelle chez les personnes travaillant avec du bétail et qui sont exposées à des aérosols hautement infectieux provenant de produits de naissance, à des particules de poussière infectieuses ou à de la laine contaminée. De même que chez les bovins, la maladie peut également être transmise par pique de tique.

L'infection est asymptomatique dans 60 % des cas mais des formes aiguës peuvent causer des syndromes grippaux et des pneumonies atypiques. Des formes chroniques sont également possibles et peuvent engendrer des endocardites, des hépatites chroniques et des ostéomyélites. Ces formes chroniques sont associées à un taux de létalité pouvant atteindre 11 % (Marrie, 1990 ; El-Mahallawy *et al.*, 2015).

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La fièvre Q a été identifiée pour la première fois en 1935 en Australie. Elle est depuis présente dans tous les pays à travers le monde, excepté la Nouvelle-Zélande (Cutler *et al.*, 2007 ; EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010). Dans l'Union européenne, il n'existe pas de règles ou de recommandations harmonisées pour la surveillance ou la déclaration des infections à *C. burnetii* et de la fièvre Q chez les animaux, rendant difficile l'estimation de la prévalence de la maladie. Cependant, la fièvre Q est présente dans l'ensemble des États membres, avec parfois une prévalence pouvant atteindre plus de 50 % des cheptels comme au Danemark (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010).

En France, la fièvre Q est considérée comme enzootique. Cependant, dû à l'absence de dépistage systématique de la maladie, sa prévalence est inconnue. Toutefois, l'ANSES estime que celle-ci a connu une augmentation légère à modérée (< 10 %) au cours des cinq dernières années et considère que 100 % des élevages bovins sont à risque d'être exposés à la maladie (ANSES, 2012).

Enfin, la fièvre Q est une maladie listée et devant être notifiée à l'Organisation Mondiale de la Santé Animale. Elle est de plus classée E dans la LSA (Commission Européenne, 2018 ; Légifrance, 2021).

C. Diagnostic sérologique

Plusieurs tests existent et sont reconnus par l'Organisation mondiale de la santé animale pour le diagnostic sérologique de la fièvre Q : test de fixation du complément, ELISAs et test par immunofluorescence indirecte. Cependant, les tests sérologiques sont adaptés au dépistage à l'échelle des troupeaux mais l'interprétation au niveau de chaque animal peut être difficile. En effet, les animaux peuvent rester séropositifs pendant plusieurs années après une infection aiguë, certains animaux peuvent excréter *C. burnetii* et présenter un risque d'infection avant le développement d'anticorps, et certains animaux infectés ne semblent pas séroconvertir. Ainsi, un résultat négatif ne donne pas l'assurance que l'animal n'est pas infecté tandis qu'un résultat positif peut être associé à la phase précoce d'une infection à *C. burnetii* ou à une infection chronique. Enfin, il n'existe actuellement pas de test sérologique permettant de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés naturellement (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018d).

Les caractéristiques notables des tests sérologiques sont présentées ci-dessous et résumées dans le Tableau 12.

ELISAs :

Il existe plusieurs kits ELISA permettant la détection des anticorps dirigés contre *C. burnetii*. Cette technique a une sensibilité élevée et une bonne spécificité selon les études comparatives entre les méthodes (Emery *et al.*, 2014; Horigan *et al.*, 2011). La méthode ELISA est souvent préférée aux tests de fixation du complément et d'immunofluorescence indirecte en raison de sa fiabilité et de sa praticité pour un dépistage à grande échelle.

Test par Immunofluorescence Indirecte (IFI) :

Comme la méthode ELISA, ce test possède une sensibilité élevée et une bonne spécificité. Il présente de plus la particularité, en médecine humaine, de permettre de distinguer une infection aiguë d'une infection chronique, celles-ci possédant en effet des profils en anticorps, et en particulier en IgG, différents. Cependant, la distinction entre forme aiguë et chronique n'a pas été validée chez les ruminants.

Test de Fixation du Complément (FC) :

Ce test est considéré comme moins sensible que l'ELISA ou l'IFI, son utilisation pour le diagnostic vétérinaire a donc déclinée.

Tableau 12 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la Fièvre Q (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010 ; Emery et al., 2014 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018d ; Lurier et al., 2021).

Technique	Sensibilité	Spécificité
ELISA	97 à 100 %*	95 à 100 %*
IFI	Équivalent à l'ELISA	
FC	89 %	82 %

*Selon les kits

L'utilisation préconisée par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale pour chacun des tests est présentée dans le tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13 : Utilisation préconisée par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale des tests de diagnostic sérologique de la Fièvre Q (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2018b).

Méthode	Circonstances d'utilisation					
	Population indemne de l'infection	Individu indemne de l'infection, avant mouvement	Contribution aux polices d'éradication	Confirmation des cas cliniques	Prévalence de l'infection et surveillance	Statut immunitaire chez les individus ou dans les populations, après vaccination
Détection de la réponse immunitaire						
ELISA	+++	-	+++	++	+++	+++
IFI	++	-	++	++	++	++
FC	-	-	-	++	+	+

Légende : +++ : recommandé pour cette utilisation ; ++ : recommandé mais présente des limites ; + : acceptable dans de rares circonstances ; - : non approprié pour cette utilisation.

13. La leptospirose

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

La Leptospirose est une maladie causée par des bactéries appartenant aux espèces *Leptospira interrogans*, *L. kirschneri* et *L. borgpetersenii*, qui comprennent plus de 300 sérovars, répartis en 25 sérogroupes. La maladie est présente chez de nombreuses classes de mammifères et chez les bovins les sérovars le plus souvent responsables de la maladie sont les sérovars Hardjo, Australis, Icterohemorrhagiae et Pomona (Ayrat *et al.*, 2014 ; Loureiro et Lilenbaum, 2020). La Leptospirose chez les bovins est le plus souvent asymptomatique, elle peut toutefois s'exprimer sous forme aiguë, donnant des septicémies,

hépatites et néphrites, ou sous forme subaiguë, donnant alors des néphrites et une chute de la production laitière. Lorsque l'infection est chronique, la Leptospirose est responsable d'avortements, de mortinatalité et d'infertilité (Eaglesome et Garcia, 1997 ; Givens, 2018).

La transmission de la maladie peut se faire par contact direct avec un animal infecté de manière aiguë ou un animal ayant guéri cliniquement mais restant porteur de la bactérie. La bactérie peut également être transmise de manière indirecte par contact avec les sécrétions d'animaux en phase aiguë de l'infection (urine, sécrétions génitales, lait). Une fois l'infection aiguë passée, certains animaux peuvent rester porteurs de la bactérie au niveau rénal et l'excréter par intermittence dans l'urine, contribuant alors à la contamination des eaux, ce qui est une autre source de transmission de la maladie. De plus, la bactérie peut se localiser dans l'épididyme et les testicules des taureaux infectés et ainsi causer la contamination de la semence. La Leptospirose peut alors être transmise par voie vénérienne (Bondurant, 2005). Lorsque des *Leptospira* sont présentes dans la semence elles sont ensuite capables de voyager dans le tractus génital femelle, indépendamment de toute association avec les spermatozoïdes, et d'infecter celle-ci (Loureiro et Lilenbaum, 2020). La transmission vénérienne peut avoir lieu lors de la monte naturelle et pourrait également avoir lieu lors de l'insémination artificielle. En effet, les bactéries du genre *Leptospira* sont capable de résister aux températures à laquelle la semence congelée est conservée mais elles sont sensibles aux antibiotiques classiquement utilisés pour le traitement des doses, ainsi pour l'instant la possibilité de la transmission de la maladie par l'IA demeure inconnue (Loureiro et Lilenbaum, 2020).

Certaines souches de *Leptospira*, en particulier celles appartenant au séro groupe Sejroe (dont fait partie le sérovar Hardjo), colonisent préférentiellement le tractus génital et sont plus étroitement associées à des syndromes reproductifs. Ainsi, chez les femelles infectées, la bactérie peut entraîner une infection chronique de l'utérus, des ovocytes et oviductes et du vagin (Loureiro et Lilenbaum, 2020). La présence de la bactérie chez les femelles contaminées est alors responsable d'infertilité, d'avortements ou de mortinatalité. De plus, lorsque l'infection survient chez une femelle à plus de la moitié de la gestation, elle peut engendrer l'infection du fœtus et ainsi donner naissance à un veau infecté (Eaglesome et Garcia, 1997 ; Bondurant, 2005). L'infertilité, les avortements et la mortinatalité observés chez les femelles infectées sont dus à deux choses : premièrement la présence de la bactérie dans le tractus génital femelle cause une inflammation utérine à l'origine d'une modification des conditions du milieu utérin qui rend difficile la survie de l'embryon ou l'implantation, deuxièmement l'infection directe de l'embryon par la bactérie est responsable de dommages causant l'avortement, la mortinatalité ou la naissance d'un animal faible et infecté (Loureiro et Lilenbaum, 2020).

Enfin, chez les mâles présentant une infection génitale chronique, la semence peut présenter une diminution de sa qualité, la rendant non viable pour la reproduction, dû à des anomalies des spermatozoïdes telles que de l'azoospermie et de la nécrospermie (Maiolino *et al.*, 2021).

La Leptospirose est une zoonose. Chez l'homme, la maladie est généralement contractée par contact avec de l'urine, du matériel placentaire ou un fœtus avorté d'un animal infecté ou avec de l'eau contaminée. Les signes cliniques de la maladie sont le plus souvent un syndrome grippal, avec des maux de tête et de la fièvre, évoluant parfois vers une méningite. Les éleveurs, personnels d'abattoir et vétérinaires sont les principaux groupes à risque (McBride *et al.*, 2005).

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La Leptospirose est présente partout à travers le monde. Toutefois, les sérovars majoritaires sont différents selon les régions du monde et peuvent donner des formes cliniques différentes.

En France, une étude de séroprévalence réalisée en 2004 a estimé que 34 % des élevages bovins étaient exposés au séro groupe Sejroe (Ayrat *et al.*, 2018). De plus, cette prévalence apparaît stable (ANSES, 2012). Enfin, l'incidence présumée de la leptospirose abortive bovine est de 1 à 3 % (Ayrat *et al.*, 2018).

Enfin, malgré son caractère zoonotique et les pertes économiques importantes qu'elle engendre, la Leptospirose ne fait pas partie des maladies listées par l'Organisation mondiale de la Santé Animale (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b).

C. Diagnostic sérologique

Les tests sérologiques sont la technique de laboratoire la plus fréquemment utilisée pour confirmer le diagnostic clinique, déterminer la prévalence du troupeau et mener des études épidémiologiques. Les anticorps anti-*Leptospira* apparaissent dès quelques jours après le début de la maladie et peuvent persister pendant plusieurs semaines ou mois, voire années. Deux tests jouent un rôle dans le diagnostic vétérinaire : le test de micro-agglutination (MAT) et le test immuno-enzymatique (ELISA) (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021f).

Test de micro-agglutination (MAT) :

Le test de micro-agglutination est le test de référence pour le diagnostic sérologique de la Leptospirose. Le MAT est utilisé pour tester les animaux à l'échelle individuelle ou de troupeaux. En tant que test individuel, le MAT est très utile pour diagnostiquer une infection aiguë : une multiplication par quatre des titres d'anticorps dans des échantillons de sérum appariés en phase aiguë et convalescente permet de poser le diagnostic. Le test MAT présente cependant des limites dans le diagnostic des infections chroniques au niveau individuel et dans le diagnostic des infections endémiques dans les troupeaux. En effet, des animaux infectés peuvent avorter ou être porteurs rénaux ou génitaux avec des titres MAT inférieurs au titre minimal significatif largement accepté de 1/100 (dilution finale), et ainsi fournir un résultat faussement négatif. Dans ce contexte, la détection directe de la bactérie devient nécessaire pour un diagnostic adéquat au niveau individuel et ainsi permettre l'identification des animaux porteurs. Ainsi, pour avoir une bonne sensibilité, le MAT doit utiliser des antigènes représentatifs de tous les sérogroupes connus dans la

région. Enfin, un avantage de ce test réside dans sa valeur épidémiologique car il permet de prédire le sérotype circulant (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021f).

ELISA :

De nombreux tests ELISA ont été mis au point et sont principalement utilisés pour la détection d'infections récentes, le dépistage d'animaux de laboratoire en vue de leur utilisation dans des études de provocation et dans des programmes de surveillance sanitaire. Ils peuvent être utilisés à l'échelle individuelle sur des prélèvements de sang ou de lait ou à l'échelle du troupeau sur lait de tank. Cependant, la sensibilité de ces tests dépend des antigènes utilisés et de la souche circulante. Ainsi, la sensibilité est parfois de moins de 50 % dans certains cas d'infections chroniques (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021f).

Les caractéristiques de ces tests sont présentées dans le Tableau 14 ci-dessous.

Tableau 14 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la Leptospirose (Otaka et al., 2012 ; Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021f).

Technique	Sensibilité	Spécificité
MAT	40 à 89 %	86 à 100 %
ELISA	Moyenne à faible	Bonne

14. La néosporose

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

La néosporose est une maladie causée par le protozoaire apicomplexe du groupe des coccidies, *Neospora caninum*. Les chiens domestiques sont l'hôte primaire et excrètent dans leurs excréments des oocystes qui sont infectieux pour les bovins. La transmission verticale est ensuite le principal mode de transmission après l'introduction de l'infection dans un troupeau.

Neospora caninum a été identifié comme une cause majeure d'avortement chez les bovins dans le monde entier. Les avortements peuvent survenir entre 3 et 9 mois de gestation, la majorité se produisant entre 4 et 6 mois de gestation. Les avortements peuvent être sporadiques, endémiques ou épidémiques, et leur prévalence est très variable. Les vaches infectées sont asymptomatiques. Lorsque l'infection ne conduit pas à l'avortement le veau peut naître faible ou avec des déficits neurologiques. En effet, une infection transplacentaire est fréquente et le système nerveux central du fœtus en est la principale cible. Le protozoaire induit alors une encéphalomyélite. Une myocardite non suppurative a également été signalée chez des fœtus ou des veaux atteints d'encéphalomyélite nécrosante focale congénitale due à la Néosporose. Ainsi, des études suggèrent que le risque de transmission verticale par une mère chroniquement infectée peut atteindre 95 %,

toutefois la grande majorité des veaux infectés congénitalement sont cliniquement normaux (Ferre *et al.*, 2005).

De plus, *Neospora caninum* a été identifié dans la semence de mâles infectés de manière chronique. Ainsi, la présence du protozoaire a été mise en évidence dans 9,8 % des échantillons de sperme provenant de taureaux infectés de manière persistante. De plus, 62,5 % des taureaux séropositifs montrent une présence intermittente de *N. caninum* dans leur semence (Ferre *et al.*, 2005). Cette présence intermittente du protozoaire dans la semence peut s'expliquer par le faible nombre de parasites présents dans le sperme ou par l'excrétion intermittente du protozoaire dans la semence. La détection intermittente pourrait également être compatible avec l'excrétion intermittente des parasites après une parasitémie. Le stade parasitaire excrété dans le sperme est plus probablement le tachyzoïte. Lorsque le parasite est présent dans la semence celui-ci se trouve systématiquement dans la fraction cellulaire du sperme et non dans le plasma séminal. Les méthodes de détection utilisées dans l'étude visant à identifier la présence de *N. caninum* dans la semence n'ont pas permis de déterminer le type de cellule associé à *N. caninum* dans le sperme, mais il est probable que les macrophages soient les cellules qui véhiculent les tachyzoïtes de *N. caninum*. Enfin, on ne sait pas si *N. caninum* circule dans le sperme de manière extracellulaire ou intracellulaire (Ferre *et al.*, 2005).

Bien que la présence de *Neospora caninum* ait été mise en évidence dans la semence des taureaux infectés chroniquement, des études indiquent que la possibilité d'une transmission vénérienne est très faible, voire inexistante (Ferre *et al.*, 2008).

La néosporose n'est pas une zoonose.

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La néosporose présente une répartition géographique mondiale (Office fédéral Suisse de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires, 2021). En effet, la présence de cas a pu être démontrée dans presque tous les pays où le parasite a été recherché, et sur tous les continents. De plus, les différentes études menées dans le monde montrent que 12 à 42 % des foetus de vaches laitières ayant avorté sont infectés par *Neospora caninum* (Dubey, 2003).

En France, il est estimé qu'environ 5 % des vaches seraient séropositives à *N. caninum* et que ce protozoaire serait ainsi responsable de 10 à 15 % des avortements (Eble, 2012). La néosporose est ainsi considérée comme étant enzootique sur le territoire et sa prévalence semble présenter une augmentation légère à modérée (ANSES, 2012).

Enfin, la néosporose n'est pas une maladie listée par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale et n'est pas classifiée dans la LSA (Commission Européenne, 2018 ; Légifrance, 2021).

C. Diagnostic sérologique

Le diagnostic sérologique de la néosporose peut se faire par immunofluorescence indirecte ou, plus fréquemment, par des tests ELISA.

Immunofluorescence indirecte (IFI) :

L'immunofluorescence indirecte a été pendant longtemps considérée comme le gold-standard pour le diagnostic sérologique de la néosporose (Reichel et Pfeiffer, 2002). Son utilisation est toutefois dorénavant largement remplacée par les tests ELISA (Alvarez-García *et al.*, 2013).

ELISA :

De nombreux tests ELISA sont commercialisés pour le diagnostic sérologique de la néosporose. La spécificité et la sensibilité varient quelque peu d'un test à l'autre mais demeurent toutefois similaires. Ces caractéristiques sont présentées dans le tableau 15 ci-dessous :

Tableau 15 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique de la Néosporose (Alvarez-García *et al.*, 2013).

Technique	Sensibilité	Spécificité
ELISA	95,7 – 99,3 %	94,0 – 100 %

15. La paratuberculose

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

La paratuberculose est une entérite chronique causée par une mycobactérie : *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP).

La contamination se fait le plus souvent chez le veau par l'ingestion de lait contaminé ou par le contact avec des fèces provenant d'animaux infectés et excréant la MAP. Une transmission verticale peut également avoir lieu chez les vaches gestantes en phase clinique de la maladie (Lilenbaum *et al.*, 2007).

La maladie évolue en trois phases : asymptomatique, subclinique (l'animal présente des signes cliniques frustrés et peu spécifiques) et clinique. Durant la seconde phase l'individu infecté excrète la bactérie de façon intermittente tandis que l'excrétion est massive durant la phase clinique (Lilenbaum *et al.*, 2007). Chez les animaux excréteurs, le bacille peut se retrouver dans les fèces, le lait, le sang mais aussi la semence (Ayele *et al.*, 2004 ; Herthnek *et al.*, 2006 ; Khol *et al.*, 2010 ; Münster *et al.*, 2013 ; Khamesipour *et al.*, 2014 ; Caldeira *et al.*, 2021). Lorsque la MAP est présente dans la semence celle-ci interagit avec les spermatozoïdes en se fixant à la surface de leur membrane. L'interaction se fait en particulier au niveau de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes où la MAP adhère à la

surface membranaire par une interaction entre les protéines 85A et 85B qu'elle possède et la fibronectine de la cellule hôte. Lorsque la MAP est adhérente à la membrane des spermatozoïdes celle-ci est responsable d'une diminution de la motilité et de la viabilité spermatique, proportionnelle à la charge bactérienne (Caldeira *et al.*, 2021).

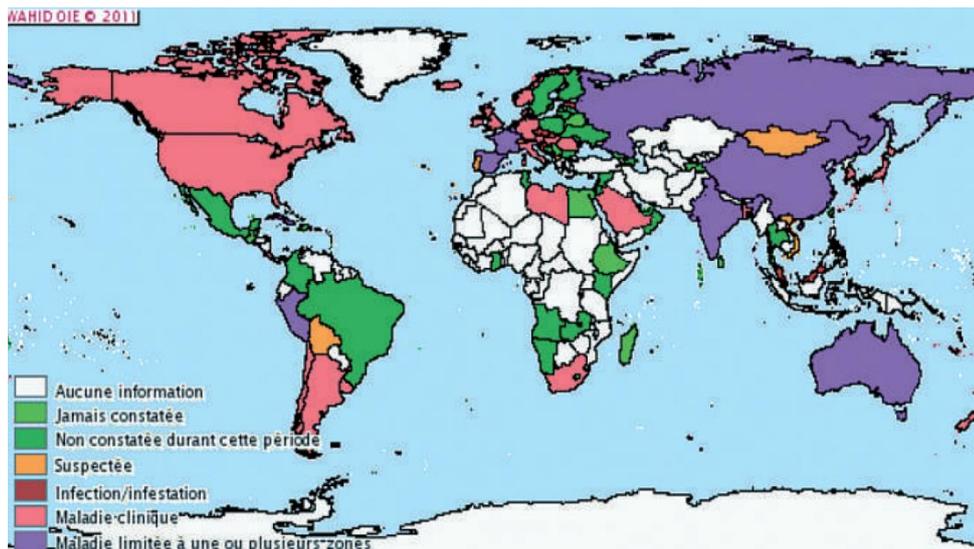
Enfin, une étude a mis en évidence la viabilité de la MAP après le processus de cryopréservation de la semence, montrant ainsi son potentiel de transmission par insémination artificielle (Caldeira *et al.*, 2021).

Le potentiel zoonotique de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* n'est pour l'heure pas clairement établi. Toutefois, la MAP semble associée à l'étiologie de la Maladie de Crohn, en tant qu'agent causal ou comme l'un des facteurs d'un syndrome multiétiologique (Hermon-Taylor *et al.*, 2000 ; Coussens, 2004 ; Shin *et al.*, 2004). De plus, la MAP peut provoquer une inflammation chronique de l'intestin chez un très grand nombre d'animaux, y compris les petits et les grands ruminants, des monogastriques tels que les chiens et les porcs, et jusqu'à présent au moins quatre types de primates sub-humains (Juárez *et al.*, 2001). Enfin, l'isolement de la MAP chez 70 % des patients atteints par la maladie de Crohn pourrait indiquer son rôle prépondérant dans l'infection (Coussens, 2004 ; Lilenbaum *et al.*, 2007). Cela est d'une importance d'autant plus particulière que 35 % des animaux en phase clinique et 10 % de ceux en phase subclinique excrètent le bacille dans le lait, et le pathogène étant résistant à la pasteurisation, cela rend la contamination des populations humaines possible (Lilenbaum *et al.*, 2007).

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La Paratuberculose a été décrite pour la première fois en 1895 en Europe. Elle a depuis été identifiée et est présente dans le monde entier (Figure 17) (Lilenbaum *et al.*, 2007).

Figure 17 : Situation de la Paratuberculose dans le monde au deuxième semestre 2010 (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021a).



En Europe, les taux de prévalence rapportés sont variables selon les pays mais demeurent toutefois élevés. Ainsi par exemple, en Angleterre une étude épidémiologique a démontré que 17,4 % des bovins ont déjà présenté des signes cliniques de paratuberculose (Lilenbaum *et al.*, 2007) tandis qu'au Danemark, une étude sérologique sur lait de tank provenant de 900 troupeaux laitiers a révélé que 70 % des troupeaux étaient positifs à l'infection par MAP (Juárez *et al.*, 2001). Finalement, une synthèse des données disponibles a montré qu'au niveau européen, 20 % des bovins et plus de 50 % des troupeaux pouvaient être considérés comme infectés par la MAP (Nielsen et Toft, 2009).

En France, la maladie est considérée comme enzootique sur l'ensemble du territoire bien que la prévalence de l'infection varie selon les régions. Les régions où elle est la plus élevée sont ainsi la Bretagne, la Normandie et le Massif Central, qui sont des foyers historiques de la paratuberculose en France, ainsi que les Pays de Loire, la région Rhône-Alpes et le quart Sud-ouest de la France (Chastel, 2008). En France, aucune étude épidémiologique n'a été menée pour déterminer la prévalence de la paratuberculose, celle-ci est toutefois considérée comme stable à l'échelle nationale mais préoccupante dans 60 % des départements (Chastel, 2008 ; ANSES, 2021).

Enfin, la Paratuberculose est une maladie classée E par la Loi Santé Animale (LSA) européenne (Légifrance, 2021), c'est-à-dire faisant l'objet d'une surveillance, et appartenant aux maladies listées au chapitre 1.3 du *Code sanitaire pour les animaux terrestres* de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale et doit en tant que telle y être notifiée (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b).

C. Diagnostic sérologique

Le dépistage de la Paratuberculose est difficile en raison de l'évolution prolongée de l'infection, de la nature essentiellement subclinique de la maladie et de l'absence de tests permettant une détection précise des animaux infectés de manière subclinique. Le test sérologique couramment utilisé pour la paratuberculose chez les bovins est le test immuno-enzymatique absorbé (ELISA). Il convient toutefois de noter que la sensibilité et la spécificité sont souvent déterminées par référence aux résultats de la culture fécale, dont la sensibilité est elle-même inconnue chez les bovins infectés de manière subclinique. Enfin, le test de fixation du complément (TFC) a longtemps été utilisé pour le diagnostic sérologique de la Paratuberculose mais n'est aujourd'hui plus recommandé (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021g).

Le test ELISA est, à l'heure actuelle, le test le plus sensible et le plus spécifique pour les anticorps sériques contre la MAP chez les bovins. Sa sensibilité est comparable à celle du TFC dans les cas cliniques, mais elle est supérieure dans les cas d'infection subclinique. La sensibilité des tests ELISA est comprise dans un intervalle allant de 7 à 94 % selon les tests et les individus mais elle est en moyenne de 30 à 40 % chez les individus en phase clinique et de 15 % chez les individus en phase subclinique. La spécificité des tests ELISA est de 40 à 100 % (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021g).

La TFC a été le test standard utilisé pour le dépistage sérologique de la Paratuberculose chez les bovins durant de nombreuses années. Il donne des résultats satisfaisants chez les animaux cliniquement suspects, mais n'est pas suffisamment spécifique pour permettre son utilisation dans la population générale à des fins de contrôle. Le TFC n'est donc pas recommandé à des fins de contrôle, ni pour des tests individuels sur les animaux avant un mouvement international ou avant l'admission dans un centre de collecte de la semence (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021g).

16. Les infections à Chlamydiées

A. Caractéristiques d'intérêt de l'agent pathogène : nom, localisation dans la semence, caractère zoonotique ou non

Les Chlamydiées sont un groupe de bactéries Gram-négatif intracellulaires obligatoires responsables d'avortements chez les bovins. Elles peuvent également provoquer des troubles oculaires, pulmonaires, génitaux, articulaires et intestinaux, mais très souvent elles sont responsables d'infections persistantes, chroniques ou subcliniques. Les Chlamydiées les plus fréquemment identifiées chez les bovins sont *Chlamydia abortus*, *C. pecorum* et *C. psittaci* (Kauffold *et al.*, 2021 ; Sharifzadeh et Forooghi, 2021).

Chez les vaches infectées, les Chlamydiées ont un tropisme pour le placenta et peuvent ainsi être responsables d'avortements à différents stades de la gestation (Storz et Whiteman, 1981 ; Cavirani *et al.*, 2001). Elles peuvent de plus être responsables d'une

subfertilité chez les vaches infectées (Petit *et al.*, 2008). Des vaginites, endométrites et salpingites ont également été rapportées chez les vaches infectées (Kauffold *et al.*, 2021). Chez les taureaux infectés, les Chlamydiées peuvent être retrouvées dans les testicules, l'épididyme et les vésicules séminales et sont ainsi responsables d'une contamination de la semence lors de l'éjaculation (Kauffold *et al.*, 2007 ; Teankum *et al.*, 2007 ; Eckert *et al.*, 2019 ; Sharifzadeh et Forooghi, 2021). Cette infection de la semence est de plus responsable d'une diminution de la fertilité des taureaux atteints. En effet, les Chlamydiées réduisent la motilité linéaire et totale des spermatozoïdes après 9 heures de co-incubation et conduisent ainsi à une réduction de la mobilité des spermatozoïdes, ce qui a pour conséquence de réduire la fécondité du sperme des taureaux infectés (Eckert *et al.*, 2019). De plus, cette diminution de la mobilité ne survenant que plusieurs heures après l'infection des spermatozoïdes par les Chlamydiées, cela explique que les spermatozoïdes infectés puissent véhiculer le pathogène au travers du vagin et du col utérin, étant ainsi responsable d'une transmission vénérienne (Teankum *et al.*, 2007 ; Rodolakis et Mohamad, 2010 ; Eckert *et al.*, 2019 ; Kauffold *et al.*, 2021 ; Sharifzadeh et Forooghi, 2021). Enfin, il convient de noter qu'il n'y a pas de corrélation entre les résultats sérologiques de la recherche de Chlamydiées et leur présence dans la semence, un résultat sérologique négatif n'excluant ainsi pas la présence du pathogène dans la semence, renforçant donc le risque de transmission par voie vénérienne (Cavirani *et al.*, 2001 ; Teankum *et al.*, 2007).

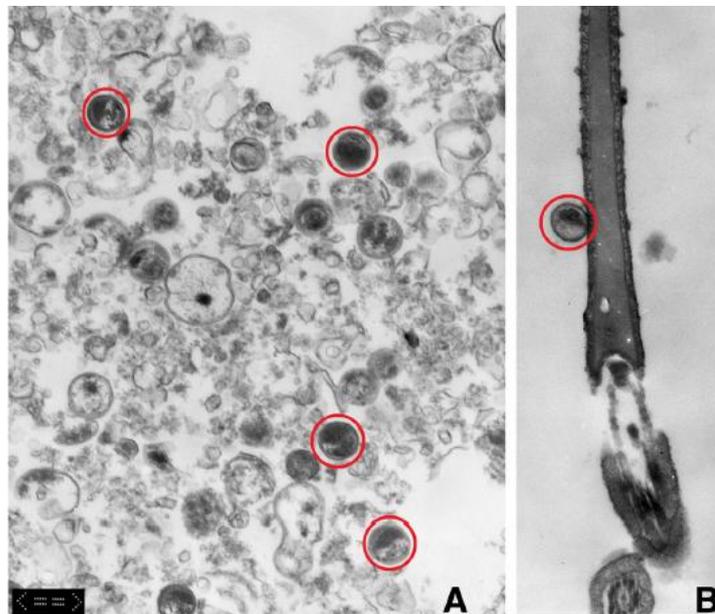
Les Chlamydiées sont des bactéries intracellulaires obligatoires avec un cycle de croissance unique. Ainsi, lorsqu'elles sont présente dans la semence, le cycle de croissance est initié par l'attachement aux spermatozoïdes des corps élémentaires infectieux (CE) (Figures 18 et 19), qui sont des particules dormantes extracellulaires des Chlamydiées. L'adhésion induit la phagocytose au sein d'un phagosome. Après avoir pénétré dans la cellule, les CE se transforment en corps réticulés végétatifs (CR) dans lesquels a lieu la synthèse macromoléculaire. Après multiplication par fission binaire, les CRs se reconvertissent en CE, qui sont libérés de la cellule hôte par lyse ou exocytose (Rodolakis et Mohamad, 2010).

Figure 18 : Liaison de *C. abortus* et *C. psittaci* aux spermatozoïdes de bovins, visualisée au microscope optique (grossissement : x 1000) (Eckert et al., 2019).



Légende : les particules orange représentent des particules de Chlamydia (A : *C. abortus* ; B : *C. psittaci*) liées à un spermatozoïde bovin. Les particules apparaissent orange en raison de l'utilisation d'un filtre bleu.

Figure 19 : Images de microscopie électronique à transmission montrant l'interaction *Chlamydia* - spermatozoïdes. (Eckert et al., 2019)



Légende : des particules de Chlamydia d'aspect typique sont entourées en rouge. A : Particules de chlamydia dans une culture de cellules de Buffalo-Green-Monkey-Kidney. B : Particule de Chlamydia spp. ressemblant à un corps élémentaire localisé à la partie apicale de la tête du spermatozoïde.

Échelle : la barre représente 0,6 μ m.

Enfin, les Chlamydiées sont responsables d'affections zoonotiques. Chez l'Homme elles peuvent en particulier causer des avortements, des pneumonies, des conjonctivites ou encore des arthrites (Rodolakis et Mohamad, 2010 ; Rohde *et al.*, 2010). La transmission

des Chlamydiées de l'animal à l'Homme se fait généralement par l'inhalation de poussières et d'aérosols infectieux qui provoquent une infection des cellules épithéliales des muqueuses et des macrophages des voies respiratoires. La bactérie finit par se propager dans le sang pour atteindre les cellules épithéliales et les macrophages dans divers organes, y compris le placenta des femmes enceintes (Rodolakis et Mohamad, 2010).

B. Situation épidémiologique et distribution géographique

La Chlamydiées ont été identifiées comme étant responsables d'infections à travers le monde. Leur prévalence est toutefois difficile à évaluer, néanmoins en Europe les études sérologiques qui ont été conduites suggèrent une prévalence élevée des infections à Chlamydiées chez les bovins (Cavirani *et al.*, 2001 ; Kauffold *et al.*, 2021).

En France, la prévalence sérologique des infections à Chlamydiées dans la population générale des bovins n'est pas connue. Néanmoins, les résultats du suivi des causes d'avortements chez les ruminants mettaient en évidence que les Chlamydiées pouvaient être imputées de façon certaine comme la cause de 3,7 % des avortements et elles ont été isolées en association avec d'autres agents abortifs dans plus de 25 % des cas d'avortements (Gache et GDS France, 2018).

Enfin, les infections à Chlamydiées ne sont pas une maladie classée par la Loi Santé Animale (LSA) européenne (Commission Européenne, 2018; Légifrance, 2021) et ne font pas partie des maladies listées au chapitre 1.3 du Code sanitaire pour les animaux terrestres de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021b).

C. Diagnostic sérologique

Les techniques de diagnostic sérologiques des infections par les Chlamydiées sont le test de fixation du complément, la technique ELISA et l'immunofluorescence indirecte.

Le TFC a pendant longtemps été la méthode la plus largement répandue pour le diagnostic sérologique des infections par les Chlamydiées. Toutefois, sa sensibilité plus faible que celle de la technique ELISA a conduit à son remplacement progressif au profit de cette dernière. De plus, le défaut de sensibilité du TFC est exacerbé chez les animaux présentant de faibles titres en anticorps comme c'est par exemple le cas chez les animaux infectés de manière chronique ou asymptomatique. Ainsi, l'obtention d'un résultat négatif au test de fixation du complément doit être confirmé par la méthode ELISA ou par immunofluorescence indirecte. De plus, les défauts de qualité du TFC rendent l'interprétation de ses résultats difficile. Il est ainsi admis que le TFC n'est pas pertinent pour juger du résultat sérologique dans un échantillon unique.

Ainsi, afin d'éviter les erreurs diagnostiques avec l'utilisation du TFC, il est considéré que celui-ci peut être une méthode fiable pour le diagnostic des infections à Chlamydiées chez les bovins symptomatiques de la maladie et présentant une augmentation significative du titre en anticorps (4 fois ou plus) dans les sérums appariés (Vlahović *et al.*, 2001).

La méthode ELISA est plus sensible que le TFC pour le diagnostic sérologique des infections à Chlamydiées. Elle présente de plus l'avantage d'être plus facilement réalisable et interprétable. De plus, son automatisation la rend plus objective et répétable (Vlahović *et al.*, 2001).

Une dernière méthode existant pour le diagnostic sérologique des infections par les Chlamydiées chez les bovins est l'immunofluorescence indirecte. Toutefois, dans un grand nombre de laboratoires les seules techniques disponibles sont le TFC et l'ELISA en raison de leur plus grande facilité de mise en œuvre, limitant ainsi l'utilisation de l'IFI (Vlahović *et al.*, 2001).

Les caractéristiques des tests de fixation du complément et ELISA sont présentées dans le Tableau 16 ci-dessous.

Tableau 16 : Résumé des caractéristiques des tests de dépistage sérologique des infections à Chlamydiées chez les bovins (Vlahović *et al.*, 2001).

Technique	Sensibilité	Spécificité
TFC	86,8 %	60,3 %
ELISA	93 %	68,0 %

Les infections à Chlamydiées demeurent ainsi un défi diagnostic. En effet, le défaut de sensibilité des méthodes de diagnostic sérologique, d'autant plus lors d'infection chronique ou asymptomatique, rend difficile l'interprétation de résultats dans des échantillons individuels. De plus, il est à noter l'absence de corrélation entre les résultats obtenus en sérologie et l'identification de Chlamydiées dans la semence ou les fèces ; un résultat sérologique négatif n'excluant pas l'excrétion de bactéries (Kauffold *et al.*, 2007 ; Teankum *et al.*, 2007). Cela rend alors le dépistage et le contrôle de ces infections difficiles (Kauffold *et al.*, 2007).

Enfin, du fait de la multiplicité des espèces de bactéries des réactions croisées peuvent survenir lors des tests sérologiques (c'est par exemple le cas entre *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. abortus* et *C. caviae*), pouvant alors engendrer de faux positifs (Vlahović *et al.*, 2001).

17. Autres bactéries : *Escherichia coli* vérotoxigène, *Histophilus somni*, *Ureaplasma diversum*, *Mycoplasma mycoides ssp. mycoides*

De nombreuses autres bactéries ont pu être identifiées dans la semence bovine comme *Escherichia coli* vérotoxigène (Gradil *et al.*, 1994), *Histophilus somni* (Givens, 2018), *Ureaplasma diversum* (Petit *et al.*, 2008) ou encore *Mycoplasma mycoides ssp mycoides* (Petit *et al.*, 2008). Peu d'informations sont toutefois disponibles sur leur prévalence, leur interaction avec les spermatozoïdes et sur leur potentielle transmissibilité par voie vénérienne, hormis pour *Ureaplasma diversum* dont la transmission par la semence a été démontrée et qui peut être responsable d'endométrite, de cervicite ou de salpingite chez les femelles infectées par voie vénérienne (Givens, 2018).

Ces bactéries ne font pour l'heure l'objet d'aucune recherche spécifique chez les taureaux utilisés dans les centres de collecte de semence (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021a).

18. Synthèse sur les maladies dont l'agent se retrouve dans la semence

Tableau 17 : Résumé des principales caractéristiques des maladies dont les agents pathogènes sont présents dans la semence bovine, classées par ordre décroissant de transmissibilité par la semence.

Nom	Localisation dans la semence	Mécanisme d'association du pathogène aux spz	Transmission par la semence	Conséquences de la présence du pathogène dans le tractus génital femelle	Infection de l'embryon / fœtus	Zoonose	Épidémiologie	Répartition géographique	Diagnostic sérologique
FA (FMDV)	Liquide séminal, intracellulaire aux spz	Pathogène intracellulaire	+	Pas d'atteinte du tractus génital femelle.	+	+ Mineure	Statut indemne	Mondiale	TNV, PNS Ac ELISA, PS Ac ELISA
IBR (BoHV-1)	Liquide séminal, adhérence aux spz	Association extracellulaire	+	Vulvovaginite Pustuleuse Infectieuse : plaques, des érosions, des ulcères et une inflammation des muqueuses vaginales et vulvaires +/- signes systémiques. Avortement.	-	-	Prévalence = 2,5 %	Mondiale	ELISA
BVD (BVDV)	Adhérence aux spz	Association extracellulaire	+	Persistence dans le tractus génital durant plusieurs semaines.	+	-	Prévalence = 70 %	Mondiale	TNV, ELISA
Tuberculose (<i>M. bovis</i>)	Liquide séminal	Pas d'association aux spz	+	Endométrite tuberculeuse.	+	+	Statut indemne Prévalence < 0,1 %	Mondiale	Aucun
CBV (<i>C. foetus venerealis</i>)	Liquide séminal et adhérence aux spz	Association extracellulaire (bactérie liée à la surface des spz)	+	Vaginites, endométrites et salpingites, infertilité.	+	+ Rare	Absente	Mondiale	Aucun
Brucellose (<i>B. abortus</i>)	Associé à la tête des spz	Association extracellulaire endommageant la membrane plasmique des spz	+	Avortement, métrite, rétention placentaire. Infection chronique et ré-invasion utérine lors de gestations.	+	+	Statut indemne Prévalence < 0,01 %	Mondiale	EAT, FC, ELISA, SAT
Trichomonose (<i>T. foetus</i>)	Liquide séminal et adhérence aux spz	Association extracellulaire (parasite lié à la surface des spz)	+	Vaginite, cervicite, endométrite, infertilité, retour tardif en chaleurs, mortalité embryonnaire précoce, avortement. Inflammation et dommage aux cellules vaginales, utérines et aux ovocytes. Élimination de l'infection en moins de 90 jours.	-	-	Inconnue	Mondiale	Aucun
Fièvre Q (<i>C. burnetii</i>)	Adhérence aux spz	Adhérence à la surface de la tête des spz	+	Avortement, mortinatalité.	+	+	Enzootique	Mondiale	ELISA, FC, IFI
Chlamydie (<i>Chlamydia spp.</i>)	Intracellulaire aux spz	Adhérence à la membrane puis phagocytose par les spz	+	Avortements, subfertilité, vaginites, endométrites, salpingites.	-	+	Enzootique	Mondiale	FC, ELISA, IFI
Paratuberculose (MAP)	Adhérence aux spz	Association extracellulaire à la membrane des spz	+	Pas d'atteinte du tractus génital femelle.	+	+/-	Enzootique	Mondiale	ELISA, FC

Légende :

Transmission vénérienne : « + » : maladie à transmission vénérienne facile et fréquente, « +/- » : maladie à transmission vénérienne possible mais rare, « - » : maladie sans transmission vénérienne malgré la présence de l'agent pathogène dans la semence.

Zoonose : « + » : maladie zoonotique, « - » : maladie non zoonotique.

Spz = spermatozoïdes

Tableau 17 : Résumé des principales caractéristiques des maladies dont les agents pathogènes sont présents dans la semence bovine, classées par ordre décroissant de transmissibilité par la semence (continuation).

Nom	Localisation dans la semence	Mécanisme d'association du pathogène aux spz	Transmission par la semence	Conséquences de la présence du pathogène dans le tractus génital femelle	Infection de l'embryon / fœtus	Zoonose	Épidémiologie	Répartition géographique	Diagnostic sérologique
Leptospirose (<i>L. interrogans</i>)	Liquide séminal	Pas d'association aux spz	+	Infection chronique de l'utérus, des ovaires et oviductes et du vagin. Inflammation utérine → avortement, mortinatalité, infertilité.	+	+	Prévalence = 34 %	Mondiale	MAT, ELISA
DNCB (VDNC)	Liquide séminal	Pas d'association aux spz	+	Nodules sur les muqueuses vaginales et vulvaires, avortement, infertilité.	+	-	Absente	En extension : Afrique, Moyen-Orient, (Balkans), Asie	TNV, ELISA
FCO (BTV)	Associé aux globules rouges et mononucléaires. Lié aux spz (BTV-8)	Association extracellulaire	+ (BTV-8 en particulier)	Mortalité embryonnaire précoce, avortement.	+	-	Prévalence = 0,016 % (BTV-8)	Mondiale (Zones de présence du vecteur compétent)	TNV, c-ELISA, AGID
Virus Schmallenberg	Liquide séminal et fraction cellulaire séminale	Pas d'association aux spz	Probable, à démontrer	Pas d'atteinte du tractus génital femelle.	+	-	Prévalence = 0,045 %	Extension depuis l'Europe	TNV, IFI, ELISA
LBE (BLV)	Associé aux lymphocytes infectés	Pas d'association aux spz	+/-	Prolifération locale de lymphocytes B dans l'utérus.	+	-	Statut indemne Prévalence < 0,01 %	Mondiale	ELISA, AGID
Néosporose (<i>N. caninum</i>)	Fraction cellulaire du sperme	Véhiculé par les macrophages	- Peu probable	Pas d'atteinte du tractus génital femelle.	+	-	Prévalence = 5 %	Mondiale	IFI, ELISA

Légende :

Transmission vénérienne : « + » : maladie à transmission vénérienne facile et fréquente, « +/- » : maladie à transmission vénérienne possible mais rare, « - » : maladie sans transmission vénérienne malgré la présence de l'agent pathogène dans la semence.

Zoonose : « + » : maladie zoonotique, « - » : maladie non zoonotique.

Spz = spermatozoïdes

Quatrième partie : les techniques innovantes de traitement antibiotique et antiviral de la semence

Malgré les nombreux tests de dépistage que subissent les animaux donateurs de semence lors du suivi sanitaire, des pathogènes, bactériens mais aussi viraux, peuvent être présents dans la semence collectée. En effet, la sensibilité des tests réalisés n'est pas parfaite, ils ne permettent donc pas d'exclure totalement la présence d'agents microbiens dans la semence (Aarestrup *et al.*, 2008; Givens, 2018; M Schulze *et al.*, 2020). De plus, toutes les maladies transmissibles par la semence ne font pas l'objet d'une recherche lors du suivi sanitaire, c'est le cas par exemple de la fièvre aphteuse, de la paratuberculose, de la néosporose ou encore de la leptospirose entre autres (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2021a). Ainsi, face au constat que, malgré tous les contrôles, il est encore possible que la semence collectée puisse présenter des agents pathogènes, il convient de s'intéresser aux traitements permettant l'élimination des bactéries et virus qu'elle pourrait contenir. Cela est d'autant plus important qu'actuellement aucune méthode conventionnelle n'est utilisée pour le traitement antiviral des doses de semence.

De plus, bien que les antibiotiques jouent un rôle essentiel dans la conservation des doses de semence, leur utilisation est de plus en plus remise en question en particulier du fait des risques de développement et de diffusion de souches bactériennes antibiorésistantes. Des recherches ont ainsi été menées au cours des dernières années dans le but de diminuer, voire de s'affranchir, de l'utilisation des antibiotiques dans les doses de semence. Plusieurs techniques prometteuses ont ainsi pu être développées.

Il convient néanmoins de rappeler que les nouvelles techniques de traitement antimicrobien de la semence doivent remplir plusieurs critères afin de pouvoir être utilisées par les industriels de l'insémination artificielle. Ces critères ont été identifiés par Schulze *et al.* (2016) et sont les suivants :

Les traitements antimicrobiens de la semence doivent :

- Présenter une activité à large spectre,
- Être dénués de toxicité pour les spermatozoïdes,
- Ne pas interférer avec la fertilité de la semence,
- Présenter une haute stabilité au cours de la conservation,
- Posséder une forte activité aux températures de stockage habituelles de la semence,
- Avoir un faible potentiel à induire des résistances bactériennes,
- Être faciles d'utilisation,
- Être viables économiquement.

Ainsi, pour chaque technique présentée ci-dessous, nous nous attacherons à en décrire le mode d'action et à en comparer l'efficacité par rapport au traitement de référence des doses de semence puis nous en décrirons les effets sur la semence (Organisation Mondiale

de la Santé Animale, 2021a; Santos et Silva, 2020; M. Schulze *et al.*, 2020). Enfin, nous évoquerons les limites spécifiques.

Enfin, certaines techniques utilisées pour le traitement de la semence animale sont également utilisées chez l'Homme, nous permettant ainsi pour certaines d'entre elles de disposer de davantage de données concernant leur efficacité ainsi que leur impact sur la semence ainsi que d'aborder d'autres techniques alternatives dont l'emploi pourrait à l'avenir être élargi à l'animal.

En effet, chez l'Homme, la qualité microbiologique de la semence utilisée pour les techniques de procréation médicalement assistée est assurée par deux moyens. Tout d'abord des dépistages sérologiques sont effectués sur les donneurs (la négativité aux tests de dépistage des infections à VIH, HTVL et des marqueurs biologiques des hépatites B et C et du cytomégalovirus est ainsi exigée (Benani-Nodot *et al.*, 1995)). Ensuite, la semence collectée est traitée dans le but d'éliminer les pathogènes pouvant être présents. Pour cela la semence subit un lavage par la technique de centrifugation par gradient de densité et des antibiotiques sont ajoutés dans les doses de semence produites. Toutefois, cette méthode de traitement de la semence, combinant antibiotiques et centrifugation par gradient de densité, n'est pas parfaite et des études montrent que certains échantillons de semence peuvent encore contenir des pathogènes même après traitement (Bielanski, 2007 ; Al-Mously *et al.*, 2009 ; Fourie *et al.*, 2012). De plus, la nécessité chez l'Homme de faire reproduire certains individus présentant des résultats positifs aux tests de dépistages sérologiques (couples de statuts sérologiques discordants pour le VIH par exemple) a motivé la recherche de techniques complémentaires pour le traitement antimicrobien des doses de semence humaine. L'ajout de substances comme la trypsine, des peptides antimicrobiens ou encore des extraits végétaux a ainsi été étudié. D'autres méthodes de traitement comme une acidification transitoire de la semence ou un traitement à l'ozone ont également été investiguées.

Ainsi, nous présenterons succinctement les résultats de ces techniques des plus anciennes et générales aux plus innovantes et spécifiques chez l'Homme ainsi que leur impact sur la qualité de la semence.

1. Techniques innovantes de traitement antibiotique et antiviral de la semence

A. Adaptation des méthodes actuelles : procédures d'hygiène et nouvelles méthodes de dosages des antibiotiques

Une première alternative en matière de traitement antimicrobien des doses de semence consiste en une adaptation des protocoles d'hygiène et de traitement actuellement utilisés. En effet, une optimisation de ceux-ci permettrait de réduire les quantités d'antibiotiques utilisées dans la semence et ainsi de réduire les risques de développement de résistances bactériennes associés. En effet, de Ruigh *et al.* (2006) ont démontré que le nombre de bactéries présentes dans le produit final était étroitement associé aux standards d'hygiène mis en place lors des processus de conditionnement de la semence.

Lorsque l'on s'intéresse au traitement antibiotique de la semence il convient tout d'abord de rechercher l'origine et la nature des bactéries retrouvées dans la semence. Ainsi, une première source de contamination bactérienne est intrinsèque aux animaux donneurs de semence. En effet, le tractus génital mâle contient des bactéries dont une partie va être retrouvée dans le sperme. Juste après sa collecte, un éjaculat contient ainsi une charge bactérienne de 10^4 à 10^6 CFU/mL (Schulze *et al.*, 2016). Néanmoins, contrairement à une idée longtemps répandue, il ne s'agit pas de la principale source de contamination bactérienne de la semence. En effet, la majorité de la contamination bactérienne de la semence survient durant son passage dans les laboratoires des centres d'IA (Schulze *et al.*, 2015a). De plus, plus de la moitié des bactéries présentes dans les laboratoires de ces établissements proviennent de la flore cutanée normale du personnel (Cobo et Concha, 2007). Ainsi, une grande part des bactéries isolées à partir des doses de semence sont des germes de l'environnement ou opportunistes associés à l'existence de défauts d'hygiène (Schulze *et al.*, 2015a).

Enfin, la majorité des bactéries contaminantes de la semence sont des bactéries Gram-négatif, appartenant le plus fréquemment à la famille des *Enterobacteriaceae* ainsi que parfois à celle des *Pseudomonadaceae* (Schulze *et al.*, 2016).

Afin de pouvoir respecter de nouveaux protocoles stricts d'hygiène il convient alors tout d'abord d'étudier l'organisation des locaux des centres de préparation des doses de semence. Nitsche-Melkus *et al.* (2020) ont établi que pour que les centres de traitement de la semence puissent maintenir une cadence suffisamment élevée les jours de pic de production tout en maintenant le respect des exigences en matière d'hygiène, une disposition appropriée des différents postes de travail dans le laboratoire est nécessaire. Ainsi il est proposé de diviser le laboratoire en zones fonctionnelles telles que : arrivée de l'éjaculat, analyse de l'éjaculat, conservation du sperme, remplissage, conditionnement, logistique, lavage et salle de stockage. L'agencement des locaux, dans l'ordre cité précédemment, a pour but de permettre de respecter le principe de marche en avant au cours du traitement de la semence afin de minimiser les contaminations au cours de celui-ci.

Ensuite, afin de maîtriser au mieux l'hygiène dans les locaux décrits précédemment il conviendra de plus de déterminer pour chacune de ces zones fonctionnelles les points

critiques de contrôle de l'hygiène (HACCPs). Ces HACCPs ont été identifiés comme étant : le transport des éjaculats, la coloration et la qualité microbiologique des colorants, le traitement et la qualité microbiologique de l'eau ultra-pure utilisée, les surfaces intérieures des couvercles des récipients de stockage, les éléments de commande manuelle et les surfaces des laboratoires. Ainsi, une pression particulièrement élevée doit s'appliquer à l'hygiène en ces points afin de maîtriser les contaminations bactériennes iatrogènes de la semence (Schulze *et al.*, 2015b).

Enfin, un autre aspect d'importance en matière d'hygiène est le management, un outil puissant pour permettre de réduire les contaminations bactériennes au sein des laboratoires de production des doses de semence, et ce dès le tout début du processus de fabrication. En effet, les études ont démontré que la motivation du personnel ainsi que sa formation jouent un rôle important dans la réduction du taux de contamination des doses de semence (de Ruigh *et al.*, 2006).

Si une hygiène stricte est un prérequis fondamental pour assurer la qualité microbiologique des doses de semence, elle n'est toutefois pas suffisante pour garantir l'absence totale de bactéries et ainsi dispenser des traitements antibiotiques. Cependant, bien qu'il soit encore nécessaire de recourir à un traitement antibactérien, il apparaît que les protocoles actuels de traitements antibiotiques peuvent être adaptés afin de pallier à certaines limites rencontrées tout en permettant une diminution des doses utilisées. C'est en effet cette piste qu'ont étudié Schulze *et al.*, (2017) afin de permettre de réduire la quantité d'antibiotiques utilisée lors de la préparation des doses de semence et de standardiser la concentration en antibiotiques à obtenir dans les doses de semences finies et non dans le diluant, contrairement à ce qui est actuellement le cas. En effet, actuellement, afin d'obtenir un nombre équivalent de spermatozoïdes dans chaque dose d'insémination une quantité variable de diluant est ajouté à la semence. Or, ce diluant contient une concentration fixe en antibiotiques, ayant pour résultat une concentration en antibiotiques variant d'une dose d'IA à l'autre. Schulze *et al.*, (2017) se sont intéressés à la concentration finale en antibiotiques dans les doses de semence de verrats. Ainsi, dans un très faible pourcentage des doses étudiées (0,09 %), la concentration finale en antibiotique était inférieure à la valeur seuil épidémiologique. Au contraire, d'autres doses contenaient de très fortes doses d'antibiotiques, bien supérieures à la concentration minimale inhibitrice des bactéries présentes habituellement dans la semence. Ces observations posent alors un double problème. Tout d'abord, l'utilisation d'antibiotiques à des doses subinhibitrices est connu pour favoriser la sélection de bactéries résistantes (Davies *et al.*, 2006), pour faciliter le transfert horizontal de gènes (Laureti *et al.*, 2013) et contribuer ainsi à la propagation de la résistance bactérienne (da Costa *et al.*, 2013). À l'opposé, les fortes concentrations d'antibiotiques obtenues dans certaines doses impliquent l'utilisation de fortes doses d'antibiotiques dans les diluants pré-dilution, ce qui ne serait pas une mesure optimale pour prévenir la contamination bactérienne dans les doses d'insémination artificielle du fait du surplus d'antibiotiques qu'elle nécessiterait, et qui, en raison de la dilution ultérieure, présenterait les mêmes risques que décrit précédemment (Schulze *et al.*, 2017).

La méthode proposée par les auteurs pour pallier à ce problème est d'utiliser une combinaison particulière de concentré de gentamicine et d'éjaculat pré-dilué puis allonger par un diluant sans antibiotique, permettant ainsi d'obtenir une concentration d'antibiotique identique dans chaque dose de semence. En pratique cela consiste à découpler l'étape de

dilution en deux sous-étapes. Ainsi, lors de leur arrivée au laboratoire les éjaculats subissent tout d'abord une étape de pré-dilution avec du diluant (i.e. BTS (Beltsville Thawing Solution)) contenant de la gentamicine à la concentration de 250 mg/L. Cette étape de pré-dilution a pour but de préserver la semence durant l'analyse de sa qualité (volume des éjaculats, leur concentration en spermatozoïdes et la mobilité spermatique) et en attendant la suite du processus de conservation. Grâce à l'information obtenue sur la concentration en spermatozoïdes à cette étape, les calculs permettant de déterminer les quantités de produits à ajouter aux étapes suivantes vont pouvoir être réalisés. La première étape de dilution à proprement parler, consiste alors à ajouter la quantité calculée de diluant ne contenant pas d'antibiotique afin d'obtenir la concentration en spermatozoïdes souhaitée dans la dose de semence. La seconde étape consiste ensuite à y ajouter du concentré d'antibiotique (i.e. solution de gentamicine à la concentration de 10 g/L ajouté dans du diluant). La quantité de ce concentré d'antibiotique à ajouter est calculée en tenant compte de deux éléments : la concentration en antibiotique nécessaire dans la dose finale de semence (pour rappel, les doses de semences contiennent actuellement une concentration d'antibiotique permettant d'égaliser l'activité antibiotique soit gentamicine (250 µg), tylosine (50 µg), lincomycine – spectinomycine (150/300 µg) ; soit pénicilline (500 UI), streptomycine (500 µg), lincomycine – spectinomycine (150/300 µg) ; soit amikacine (75 µg), divexacine (25 µg) (Communauté Economique Européenne, 1990, 2003)) et deuxièmement de la quantité d'antibiotique (ici de gentamicine) déjà présente dans la semence du fait de la pré-dilution. Cette étape permet ainsi de compléter les doses avec la quantité d'antibiotique juste nécessaire pour obtenir la concentration finale souhaitée. Cela permet d'éviter un sous-dosage de même qu'un surdosage. De plus, les mesures effectuées sur différents paramètres du sperme (motilité, activité mitochondriale, intégrité de la membrane et mobilité fléchante des spermatozoïdes) ont montré que cette méthode ne causait pas d'altération de la qualité de la semence, en comparaison avec la semence traitée de manière classique.

Pour conclure, l'adaptation des protocoles d'hygiène et de traitement antibiotique de la semence apporte une première solution alternative simple, facile d'application et peu coûteuse, pour permettre de limiter l'usage des antibiotiques dans les doses de semence sans toutefois en hypothéquer la qualité microbiologique (de Ruigh *et al.*, 2006 ; Schulze *et al.*, 2017 ; Nitsche-Melkus *et al.*, 2020). De plus, l'addition de l'antibiotique basée sur le volume final des doses de semence et normalisée dans les éjaculats, comme démontré chez le ver rat, peut être une alternative utile pour éviter un dosage insuffisant ou excessif d'antibiotiques dans le sperme conservé frais réfrigéré sans en affecter la qualité (Schulze *et al.*, 2017).

B. Sélection des individus avec une haute activité interne de destruction des bactéries (AIDB)

Une technique prometteuse pour faire évoluer le traitement antimicrobien des doses de semence, mais qui n'en est qu'à ses prémices dans les études, est la sélection des individus donneurs en fonction de l'activité interne de destruction des bactéries (AIDB) de leur liquide séminal. En effet, Rowe *et al.* (2011) ont mis en évidence l'existence d'une activité antibactérienne interne dans la fraction du liquide séminal, le mécanisme de celle-ci n'est toutefois pas encore connu. Par la suite, Schulze *et al.* (2019) et Jakop *et al.* (2019) ont mis en évidence cette AIDB chez les suidés et les bovidés, respectivement. De plus, Schulze *et*

al. (2019) ont montré que chez le porc cette AIDB est efficace pour lutter contre *E. coli* et que cette activité antibactérienne varie selon les individus.

Ainsi, des études plus poussées sur ce mécanisme de défense interne pourraient permettre de sélectionner les individus présentant une AIDB élevée afin de réduire la concentration bactérienne dans les éjaculats obtenus. De plus, l'identification des substances responsables de l'AIDB pourrait simplifier le développement de nouvelles alternatives antimicrobiennes, qui présenteraient en plus pour avantage d'être compatibles avec la semence (Schulze *et al.*, 2019).

C. Centrifugation par gradient de densité et centrifugation en couche unique

La centrifugation représente un traitement physique qui permet de réduire la charge bactérienne d'une solution. Ainsi, la centrifugation par gradient de densité et la centrifugation en couche unique ont été investiguées pour le traitement antimicrobien de la semence. En effet, ces méthodes ont pour but de réduire la concentration bactérienne initiale dans les éjaculats et concentrer la semence afin de réduire les quantités d'antibiotiques dans la préparation et la conservation de la semence.

Dans une première étude pilote, Nicholson *et al.* (2000) ont démontré la possibilité de séparer des spermatozoïdes humains des bactéries d'un éjaculat en utilisant la centrifugation par gradient de densité.

Morrell et Wallgren, (2011a) ont adapté cette méthode à la semence porcine en utilisant la technique de centrifugation en couche unique (CCU). Cette méthode qui reposait sur la formation de gradients de densité par deux couches ou plus de Percoll (un colloïde constitué de silice enrobée de polyvinylpyrrolidone (PVP)), ou de silice enrobée de silane, mélangées à diverses solutions salines, par exemple des sels de Tyrode concentrés, présentait plusieurs inconvénients. Tout d'abord, le Percoll initialement utilisé s'est révélé être toxique pour les spermatozoïdes. Ensuite, cette technique ne permettait de traiter que des échantillons de petits volumes, la rendant trop chronophage pour l'appliquer au traitement des doses de semence pour l'IA. Une adaptation de la centrifugation par gradient de densité a ainsi conduit à la technique de centrifugation en couche unique. La CCU utilise une seule couche de colloïde. Le colloïde utilisé (Percoll) présente de plus la caractéristique d'être spécifique de l'espèce dont la semence est traitée. La technique de CCU permet de traiter la semence afin de séparer les spermatozoïdes des bactéries et virus qu'elle contient. Elle permet également de sélectionner les spermatozoïdes viables. Ainsi, lors du traitement d'un éjaculat, le plasma séminal va être séparé au cours de la centrifugation et retenu au sommet du colloïde tandis que les spermatozoïdes descendent à travers le colloïde, les spermatozoïdes viables et mobiles se déposant au fond du tube (Morrell et Wallgren, 2011a).

Plusieurs effets de la CCU sur la semence porcine ont été étudiés. Ainsi, Morrell et Wallgren (2011b) ont montré que la CCU permet de réduire fortement, voire de supprimer, la contamination bactérienne des échantillons de semence traités. De plus, ils ont démontré

que la CCU n'affectait pas la qualité des spermatozoïdes, la mobilité spermatique et la motilité linéaire n'étant en effet pas altérées par cette technique. Toutefois, le nombre de spermatozoïdes était diminué dans les échantillons traités en comparaison des échantillons non traités (Tableau 18).

Tableau 18 : Numération bactérienne et identité des contaminants bactériens dans les échantillons de sperme de verrat centrifugés par centrifugation en couche unique ou non (n= 10 éjaculats) (Morrell et Wallgren, 2011a).

Porc n°	0 h après CCU		24 h après stockage entre 16 et 18 °C	
	Témoin	CCU	Témoin	CCU
1	Flore mixte + Streptocoques hémolytiques α environ 4000 CFU/mL	Pas de croissance bactérienne	Flore mixte + Streptocoques hémolytiques α environ 40 CFU/mL	Pas de croissance bactérienne
2	<i>Staphylococcus spp.</i> environ 500 CFU/mL	<i>S. aureus</i> en culture pure 1000 CFU/mL ^a	<i>Staphylococcus spp.</i> environ 50 CFU/mL	Pas de croissance bactérienne
3	Streptocoques hémolytiques α environ 1000 CFU/mL	Pas de croissance bactérienne	Discrète croissance de <i>Bacillus spp.</i>	Pas de croissance bactérienne
4	Absence de bactéries	Pas de croissance bactérienne	Pas de croissance bactérienne	Pas de croissance bactérienne
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6800 CFU/mL + Staphylocoques à coagulase négative 600 CFU/mL	Pas de croissance bactérienne	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> > 10 000 CFU/mL	Pas de croissance bactérienne
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10000 CFU/mL + Staphylocoques à coagulase négative 800 CFU/mL	Pas de croissance bactérienne	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> > 10 000 CFU/mL + <i>Streptococcus spp.</i> 2900 CFU/mL	Pas de croissance bactérienne
7	<i>Burkholderia spp.</i> 500 CFU/mL + <i>Citrobacter spp.</i> 500 CFU/mL	<i>Burkholderia spp.</i> 50 CFU/mL	<i>Citrobacter spp.</i> 10 000 CFU/mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 200 CFU/mL
8	<i>E. coli</i> 3000 CFU/mL	<i>E. coli</i> 150 CFU/mL	<i>E. coli</i> 5000 CFU/mL	<i>E. coli</i> 300 CFU/mL
9	<i>Pantoea spp.</i> 1000 CFU/mL + <i>Citrobacter spp.</i> 200 CFU/mL	<i>Pantoea spp.</i> 1000 CFU/mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3000 CFU/mL + <i>Citrobacter spp.</i> 300 CFU/mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 200 CFU/mL + <i>Pantoea spp.</i> 200 CFU/mL
10	<i>Pantoea spp.</i> 260 CFU/mL	Coques Gram + 70 CFU/mL	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 20 CFU/mL + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 100 CFU/mL	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 40 CFU/mL

Légende : CCU = centrifugation en couche unique. Témoin = échantillon non centrifugé. Les échantillons 1 à 6 ont été dilués avec du diluant BTS sans antibiotique, les échantillons 7 à 10 avec du diluant Xcell sans antibiotique.

^a Résultats considéré comme étant dû à une contamination du tube à essai après CCU, les autres échantillons du mélange n'ayant montrés aucune croissance bactérienne en 24 h.

La méthode de CCU s'est également révélée efficace pour diminuer de manière importante la contamination virale de la semence. C'est en effet ce qu'ont démontré Blomqvist *et al.* (2011) dans une étude réalisée sur la semence porcine contaminée par

Circovirus porcin de type 2 (PCV2). Pour cela, les auteurs ont traité des échantillons de semence par la technique de CCU suivi d'un « swim-up » (étape consistant à placer les spermatozoïdes obtenus par CCU dans un tube avec 1,5 mL de diluant BTS et de les faire incuber pendant 45 min à 37°C afin de permettre aux spermatozoïdes de nager vers le haut du milieu et de prélever ensuite 1 mL en surface du tube). Les résultats de cette expérience montrent que le titre infectieux initial (exprimé en \log_{10}) était de 3,25–3,82 TCID₅₀/50 μ L (TCID₅₀ : *Median Tissue Culture Infectious Dose* : unité quantifiant la quantité de virus nécessaire pour détruire ou nuire par tout autre type d'effet cytopathique aux cellules dans 50 % des cellules ou des cultures infectées). Après le traitement en deux étapes ce titre viral était réduit de $2,92 \pm 0,23$ logs de PCV2 infectieux, soit une réduction de plus de 99 % du titre viral initial. Cependant, la grande variabilité dans les résultats était causée par l'étape de swim-up et les auteurs estiment que le traitement des échantillons par deux passages successifs en CCU fournirait les mêmes résultats que précédemment sur la réduction de la charge virale, sans altérer la qualité des spermatozoïdes. Des études devront alors être menées pour vérifier cette hypothèse, qui permettrait de simplifier et de diminuer le temps nécessaire au traitement.

Cette technique pourrait donc représenter un atout important dans le traitement antiviral des doses de semence et ainsi dans la biosécurité au cours des inséminations artificielles.

En plus de permettre de retirer les pathogènes de la semence, la technique de CCU pourrait également permettre de sélectionner les spermatozoïdes de morphologie normale, augmenter la durée de vie de la semence au cours de sa conservation et améliorer la survie et la fertilité de la semence cryoconservée (Morrell et Wallgren, 2011a).

Cependant, bien que performante quant à son rôle antimicrobien, cette méthode présente pour l'instant plusieurs limites à son utilisation par les industriels de la semence. En effet, le temps supplémentaire que nécessite cette technique, la perte de spermatozoïdes qu'elle entraîne ainsi que le coût élevé des colloïdes sont autant d'éléments qui freinent son développement. Cependant, les auteurs estiment que des adaptations de la technique pourraient permettre à l'avenir son utilisation par les industriels. Ainsi, la CCU permet d'obtenir une semence de meilleure qualité, en permettant de sélectionner seulement les spermatozoïdes viables et de morphologie normale, ce qui pourrait compenser une perte de spermatozoïdes durant le procédé. Cela combiné à des colloïdes de plus bas coût pourrait rendre la technique plus attractive pour être utilisée en pratique (Morrell, 2019).

Chez l'Homme, la semence subit un lavage par la technique de centrifugation par gradient de densité, parfois associée à la technique de « swim-up » (c'est-à-dire de remontée à la surface des spermatozoïdes viables). Le large recours à cette technique de centrifugation pour le traitement de la semence a donc invité les chercheurs à en évaluer l'impact sur la qualité de la semence, fournissant ainsi des données intéressantes à des fins prospectives pour son utilisation dans les centres d'insémination artificielle bovins. Ainsi, l'impact de la centrifugation sur la qualité de la semence a été plus largement étudié chez l'Homme, en particulier concernant les effets de la technique de centrifugation par gradient de densité. Ainsi, celle-ci permettant la sélection des spermatozoïdes viables, elle permet

alors une augmentation significative de la motilité spermatique moyenne, en comparaison avec la semence fraîche (Zini *et al.*, 2000). Toutefois, bien que cette technique permette de concentrer les spermatozoïdes viables et ainsi d'augmenter la motilité moyenne, ses effets sur l'intégrité de l'ADN sont controversés. L'intégrité de l'ADN est un critère important à évaluer pour déterminer la qualité de la semence. En effet, la seule évaluation morphologique de la semence n'est pas toujours prédictive de la fécondité de la semence, tandis que le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes est quant à lui corrélé négativement avec le taux de fécondation, par reproduction naturelle et par insémination artificielle (Jackson *et al.*, 2010). Or, les différentes études sur les effets de la centrifugation par gradient de densité sur la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes chez l'Homme donnaient des résultats divergents, certaines mettant en évidence une diminution de la fragmentation de l'ADN après recours à cette technique tandis que d'autres montraient une augmentation de celle-ci et donc davantage de dommages causés à l'ADN par cette technique, par rapport à la semence fraîche (Jackson *et al.*, 2010). Toutefois, Muratori *et al.* (2019) ont récemment évalué la fragmentation de l'ADN uniquement sur des spermatozoïdes viables traités par centrifugation par gradient. Les auteurs ont mis en évidence une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN de ces spermatozoïdes pouvant être responsable d'une diminution de la fécondité de la semence.

D. Microfiltration

Une autre technique de traitement physique antibactérien de la semence envisagée pour éviter le traitement antibiotique est la technique de microfiltration utilisée communément pour débarrasser une solution des bactéries qu'elle contient. Cependant, dans le cas de la semence, l'utilisation de cette technique nécessite de prendre en compte un paramètre particulier : la séparation des spermatozoïdes et du liquide séminal. En effet, au cours du procédé les spermatozoïdes et le liquide séminal sont séparés. Bien que les deux composants soient ensuite rassemblés, certaines molécules du liquide séminal pourraient être retenues par la technique de microfiltration. Or, il est connu que le liquide séminal joue un rôle protecteur pour les spermatozoïdes au cours de la conservation de la semence.

L' étude préliminaire de Barone *et al.* (2016) avait donc pour but d'évaluer différents paramètres de qualité de la semence traitée par microfiltration durant son stockage. Tout d'abord, lorsqu'appliquée à la semence, la technique de microfiltration consiste à séparer les spermatozoïdes du liquide séminal par une centrifugation douce. Le liquide séminal est ensuite filtré à travers des filtres avec des tailles de pores décroissantes jusqu'à 0,22 μm . Les spermatozoïdes et le liquide séminal sont ensuite remélangés ensemble.

Selon Barone *et al.* (2016) les doses d'IA de semence microfiltrée et sans ajout d'antibiotique conservées durant 7 jours à 16°C présentent des valeurs absolues de viabilité des spermatozoïdes, de potentiel de la membrane mitochondriale, d'intégrité de l'acrosome et de motilité objective égales voire meilleures que celles observées dans les doses conventionnelles.

Bien que les résultats puissent être considérés comme préliminaires en raison de la petite taille de l'échantillon utilisé et du faible nombre d'espèces de bactéries recherchées pour quantifier la charge bactérienne dans cette expérience, cette étude suggère que la microfiltration de la semence peut être une méthode simple, réalisable dans les fermes, pour remplacer l'utilisation d'antibiotiques dans les doses de semence diluées et conservées à 16°C jusque pendant 7 jours (Barone *et al.*, 2016).

E. Les huiles essentielles

Une alternative prometteuse pour le traitement antibactérien de la semence, mais encore peu développée notamment en raison de la très grande diversité de molécules disponibles à étudier, est l'utilisation d'huiles essentielles.

Les huiles essentielles et leurs composants sont capables d'exercer une grande variété d'actions antibactériennes mais aussi antivirales. Les huiles essentielles peuvent par exemple affecter la structure des bactéries en interférant avec les membranes cytoplasmiques et en diminuant la synthèse de l'ATP (Nazzaro *et al.*, 2013). Ainsi, compte-tenu de ces propriétés antimicrobiennes les huiles essentielles pourraient représenter une alternative ou un traitement complémentaire aux antibiotiques dans les doses de semence. Toutefois, en dépit de la variété de molécules disponibles et de leur activité antibactérienne connue, des études seront nécessaires pour démontrer leur efficacité pour le traitement antibactérien des doses de semence. Il sera de plus nécessaire pour chaque phyto-extrait, avant même d'envisager de l'employer comme agent antibactérien dans la semence, d'évaluer son impact sur les spermatozoïdes. Ainsi, les huiles essentielles d'Arbre à thé (Elmi *et al.*, 2019), de Thym (Chikhouné *et al.*, 2015) ou encore de Romarin officinal (Touazi *et al.*, 2018) ont fait l'objet de telles études. Cependant, certaines huiles essentielles sont riches en monoterpènes, comme par exemple l'huile essentielle d'arbre à thé ou de thym, et peuvent être cytotoxiques pour les spermatozoïdes et ne conviennent donc pas comme additifs des diluants pour la conservation des doses de semence (Chikhouné *et al.*, 2015 ; Cavalleri *et al.*, 2018 ; Elmi *et al.*, 2019).

Un exemple de phyto-extrait prometteur pour l'utilisation dans les doses de semence est l'extrait aqueux d'écorce de margousier (*Azadirachta indica*), qui a montré une activité antibactérienne dans la semence porcine diluée et n'a pas eu d'effet néfaste sur la qualité du sperme à des concentrations allant jusqu'à 25 % (Ilori *et al.*, 2019).

De même, l'ajout d'extrait de curcumine à une concentration de 5 % dans des échantillons de semence bovine a montré la capacité à réduire de 32 % la charge bactérienne dans les échantillons, sans en affecter la qualité (Cojkic *et al.*, 2023).

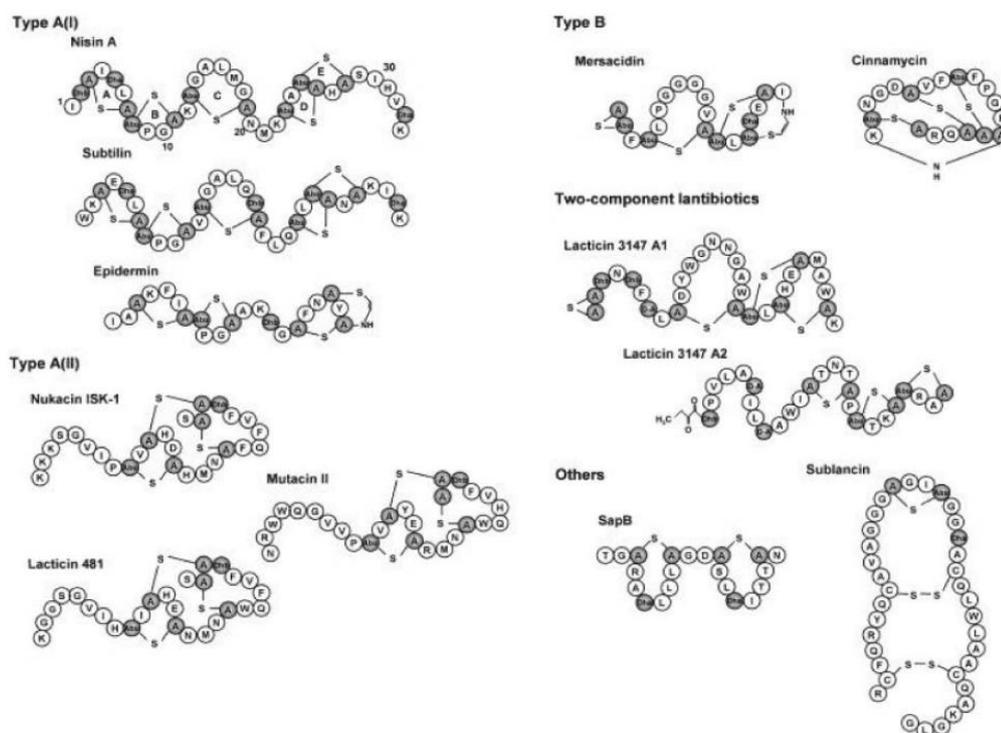
Chez l'Homme, l'huile essentielle d'Elémi (*Canarium luzonicum*) a montré une forte activité inhibitrice envers des Staphylocoques présents dans des échantillons de semence (Kačániová *et al.*, 2020). Toutefois, aucune donnée n'est pour l'heure disponible quant à son impact sur les spermatozoïdes.

F. Les bactériocines

D'autres agents antimicrobiens prometteurs sont les bactériocines : de petits peptides bactéricides ou bactériostatiques synthétisés par les bactéries et jouant un rôle régulateur dans les écosystèmes bactériens. Ils permettent ainsi aux souches bactériennes productrices de lutter contre les espèces bactériennes concurrentes. De plus, les bactériocines produites par les bactéries Gram-positif possèdent un large spectre d'action.

Les bactériocines possèdent différents modes d'action selon la classe à laquelle elles appartiennent. Les bactériocines de classe I, nommées lantibiotiques, se lient au lipide II, transporteur situé dans la membrane bactérienne et ayant pour rôle d'exporter les molécules de peptidoglycane vers la paroi. La liaison des bactériocines empêche cette fonction et déstabilise à terme la paroi bactérienne. De plus, les lantibiotiques peuvent également s'insérer dans la membrane bactérienne et y former des pores qui conduisent à la mort de la cellule. La représentation schématique de la structure de quelques lantibiotiques est donnée à la Figure 20. Les bactériocines de classe II, les non-lantibiotiques, s'insèrent à l'aide de leur structure hélicoïdale amphiphile dans la membrane bactérienne et provoquent une perméabilisation de celle-ci et une dépoléarisation par fuite d'ions. Elles peuvent également causer une diminution de la concentration intracellulaire en ATP. Enfin, les bactériocines de classe III, les bactériolysines, induisent la lyse des bactéries par leur activité hydrolytique sur la paroi (Bali *et al.*, 2016).

Figure 20 : Représentation de la structure de quelques lantibiotiques (Bali *et al.*, 2016).



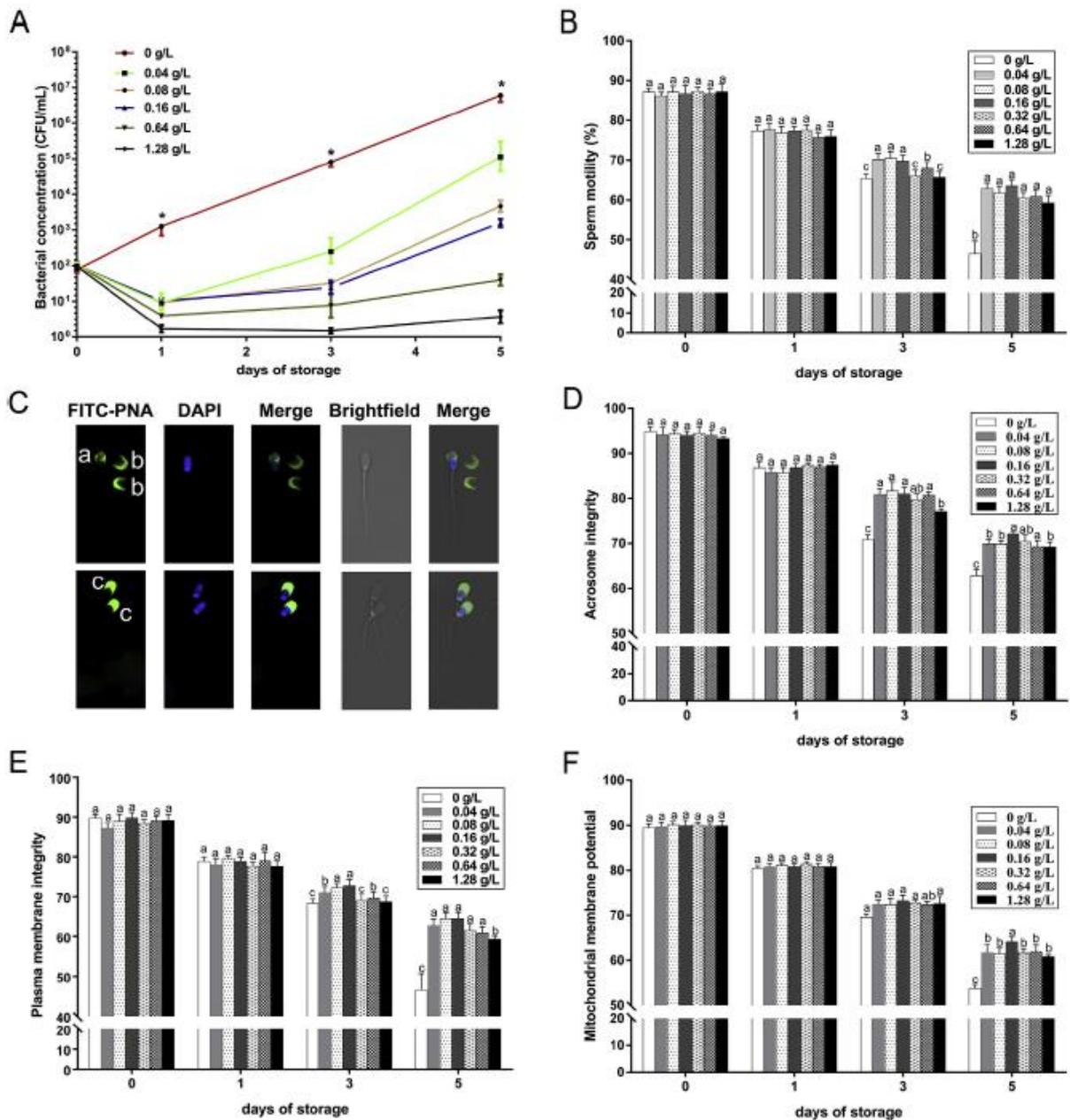
Les bactériocines ont de plus montré leur efficacité dans la prévention de la contamination bactérienne et la régulation de la croissance des bactéries dans les produits de l'industrie alimentaire. Elles sont ainsi utilisées comme conservateur dans de nombreux types d'aliments (produits laitiers, produits de boulangerie et pâtisserie...) (Bali *et al.*, 2016 ; Silva *et al.*, 2018). Par exemple, au Japon et en Corée, la ϵ -polylysine est souvent utilisée dans l'industrie alimentaire et possède de puissants effets antibactériens. Une étude menée en 2019 sur la ϵ -polylysine a de plus mis en lumière son intérêt comme traitement antimicrobien potentiel des doses de semence.

La ϵ -polylysine est un peptide dont l'activité antimicrobienne s'est révélée efficace contre de multiples sortes de pathogènes : des levures, des champignons, des bactéries à Gram-positif et Gram-négatif et des bactériophages. Elle est composée de 25 à 30 résidus de L-lysine qui a été isolée à partir du sol pour la première fois en 1977. Sa structure, composée de résidus de lysine, lui confère une charge fortement positive, qui permet son mode d'action. En effet, la ϵ -polylysine chargée positivement se lie aux membranes bactériennes chargées négativement et induit des dommages à certains composants vitaux des cellules. Elle endommage ainsi la membrane cellulaire, réduit l'activité de la superoxyde dismutase amoindrissant ainsi les mécanismes de défense contre l'oxydation et causant l'augmentation de la production de radicaux libres. L'ensemble de ces phénomènes conduit finalement à l'apoptose de la bactérie.

Dans l'étude réalisée en 2019, le Dr Shaoyong et ses collègues ont évalué l'efficacité de l'activité antimicrobienne de la ϵ -polylysine dans des doses de semence porcine conservée sous forme liquide. Ils ont également étudié l'effet de ce peptide sur la qualité et la fertilité de la semence au cours du stockage (Shaoyong *et al.*, 2019).

Ainsi, la première expérience a consisté à compléter des échantillons de semence porcine avec différentes concentrations de ϵ -polylysine puis différents paramètres ont été mesurés : concentration bactérienne, motilité spermatique, intégrité de la membrane plasmique, intégrité de l'acrosome et potentiel de membrane mitochondrial (Figure 21).

Figure 21 : Effet de la supplémentation à différentes concentrations d' ϵ -polylysine sur la concentration bactérienne totale et les paramètres de qualité du sperme de verrat conservé à 17 °C pendant 5 jours (Shaoyong et al., 2019).



* Différences significatives ($p < 0,05$) entre le témoin (semence non traitée) et le traitement.
 Les différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les valeurs.

Cette expérience met en évidence que l'ajout de ϵ -polylysine à la semence permet de limiter la croissance bactérienne et améliore de manière significative les paramètres de qualité de la semence que sont la motilité spermatique, l'intégrité de la membrane plasmique et de l'acrosome et le potentiel de membrane mitochondrial. De plus, ces résultats indiquent que la concentration optimale de ϵ -polylysine à utiliser est de 160 mg/L. Cette concentration est celle pour laquelle les paramètres de qualité de la semence présentent la plus forte

amélioration tout en possédant une activité antibactérienne satisfaisante. Enfin, l'ajout de ϵ -polylysine augmente significativement la fertilité *in vitro* de la semence. En effet, les auteurs ont mis en évidence que lorsque le sperme de verrat supplémenté avec différentes combinaisons d' ϵ -PL et de gentamicine a été utilisé pour la fécondation *in vitro*, le nombre de spermatozoïdes attachés par ovocyte, le taux de pénétration et le taux de fécondation global étaient augmentés de manière significative dans tous les groupes de semence traitée par rapport au groupe témoin. De plus, la fécondation avec différentes combinaisons de ϵ -PL et de gentamicine a produit des taux de clivage et des taux de blastocystes significativement plus élevés dans tous les groupes de traitement que dans le groupe témoin.

La seconde expérience de cette étude avait pour objectif d'étudier les effets de l'association entre la ϵ -polylysine et la gentamicine. Pour cela des doses de semence supplémentées avec un mélange de ϵ -polylysine à la concentration de 160 mg/L et différentes concentrations de gentamicine ont été comparées avec des doses supplémentées en gentamicine seule à 250 mg/L sur les mêmes paramètres que précédemment.

Les résultats de cette expérience ont mis en évidence que l'activité antibactérienne d'un mélange de 160 mg/L de ϵ -polylysine et de 125 mg/L de gentamicine était similaire à celle d'une solution de gentamicine à la concentration de 250 mg/L. De plus, comme observé lors de l'emploi de la ϵ -polylysine seule, les paramètres de qualité de la semence et la fertilité *in vitro* étaient significativement augmentés lors de l'utilisation du mélange de 16 mg/L de ϵ -polylysine et de 125 mg/L de gentamicine comparé à la gentamicine seule à 250 mg/L.

L'emploi de ϵ -polylysine à la concentration de 160 mg/L est donc un traitement prometteur pour permettre le remplacement, partiel ou total, de la gentamicine lors de la conservation sous forme liquide des doses de semence porcine en raison de ses effets de réduction de la concentration bactérienne et d'amélioration de la qualité de la semence et de sa fertilité (Shaoyong *et al.*, 2019).

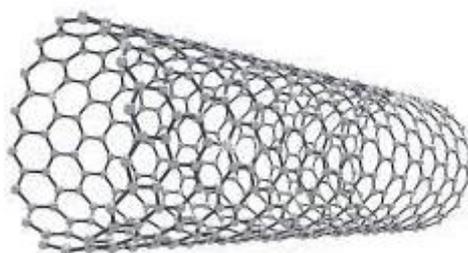
Enfin, d'autres bactériocines ont été étudiées, telles que le peptide Protégrine 1 ou la Pédiocine PA-1, mais les résultats indiquent que certaines des bactériocines testées ont réduit la qualité du sperme et cela dès une concentration permettant de réduire de 50 % la concentration bactérienne pour la Protégrine 1. De plus, les effets délétères étaient d'autant plus marqués que les doses utilisées étaient élevées. La bactériocine pédiocine PA-1, produite par *Pediococcus acidilactici*, a, quant à elle, eu un effet positif sur la viabilité des spermatozoïdes à des concentrations croissantes, mais n'a pas réussi à réduire la croissance bactérienne pendant le stockage jusqu'à une concentration de 350 ng/ml. Ainsi, davantage d'études devront être réalisées afin d'identifier de nouvelles bactériocines potentiellement utilisables pour le traitement et la conservation des doses de semence et leurs effets sur les spermatozoïdes évalués (Sancho *et al.*, 2017).

G.Nanoparticules : les nanotubes de carbone à paroi unique PEGylés et les nanoparticules d'argent

D'après Feugang *et al.* (2019), les nanotechnologies pourraient permettre d'accroître la sécurité des doses de semence utilisées pour l'IA en diminuant la quantité d'antibiotique nécessaire pour tuer les bactéries résiduelles et préserver la santé des femelles inséminées. En particulier, des études ont démontré les effets antibactériens des nanotubes de carbone monoparois PEGylés et des nanoparticules d'argent sur la croissance de bactéries *in vitro*.

Les nanotubes de carbone sont des formes allotropiques du carbone appartenant à la famille des fullerènes. Ils peuvent être composés d'une ou plusieurs couches enroulées pour former un tube (Figure 22). De plus, les surfaces des nanotubes de carbone peuvent être modifiées afin de réduire leur hydrophobicité et ainsi d'améliorer leur liaison aux protéines et polymères cellulaires. Une bonne stabilité dans les solutions aqueuses est une caractéristique nécessaire pour les applications microbiologiques des nanoparticules. Ainsi, parmi les nanoparticules utilisées en biologie se trouvent les nanotubes de carbone monoparois PEGylés. Les caractéristiques de leur paroi leur confèrent une activité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Cette activité bactéricide est due au mode d'action physique des nanotubes sur les cellules bactériennes et à l'induction d'un stress oxydatif causant des lésions à la membrane bactérienne qui aboutissent à sa mort. Une étude a évalué les effets antibactériens des nanotubes de carbone monoparois PEGylés sur des cultures d'*Escherichia coli* et de *Bacillus subtilis*. Les résultats de cette étude montrent que les nanotubes de carbone monoparois PEGylés provoquent un allongement de la phase de latence des bactéries, des changements d'expression des protéines et une inhibition de la croissance bactérienne au cours d'expériences réalisées *in vitro* (Mocan *et al.*, 2017).

Figure 22 : Structure d'un nanotube de carbone à monoparois (Barreteau, 2021).



Une autre étude s'est intéressée aux effets des nanoparticules d'argent. Alors que le rôle antimicrobien des sels d'argent est bien connu, les auteurs ont voulu savoir ce qu'il en était pour les nanoparticules d'argent. Des expériences ont ainsi été réalisées afin de tester l'efficacité antibactérienne de nanoparticules, préparées de façon à augmenter leur solubilité, sur des cultures d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*. Les résultats ont montré que les nanoparticules d'argent permettent une inhibition complète de la croissance

bactérienne et ont déterminé les concentrations minimales inhibitrices : entre 3,3 et 6,6 nM pour *E. coli* et 33 nM pour *S. aureus*.

Compte-tenu de ces résultats les auteurs concluaient que les nanoparticules d'argent sont des agents antimicrobiens très prometteurs qui pourraient trouver à l'avenir des applications dans de nombreux domaines (Kim *et al.*, 2007).

Pour conclure, l'utilisation de nanoparticules dans les diluants pour les doses de semence, en complément ou en remplacement des antibiotiques, devrait améliorer la sécurité sanitaire des doses de semence et être un outil permettant de limiter le développement des résistances aux antibiotiques. Néanmoins, davantage d'études devront être réalisées afin d'évaluer en particulier la cytotoxicité des nanoparticules envers les spermatozoïdes ainsi que leurs effets *in vivo* chez les femelles inséminées avant de pouvoir développer leur utilisation (Feugang *et al.*, 2019).

H. Les peptides antimicrobiens : les dérivés synthétiques de la magainine et les hexapeptides cycliques

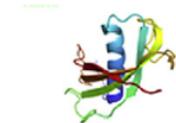
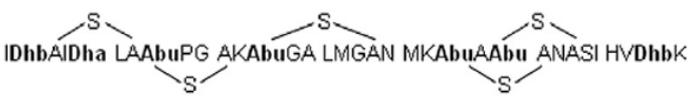
a. Qu'est-ce-que les peptides antimicrobiens ?

Les Peptides Anti-Microbiens (PAM) sont des composants synthétisés par de très nombreux êtres vivants, qu'ils soient unicellulaires (bactéries, levures...), mais aussi des êtres vivants complexes. Ils sont ainsi un constituant important du système immunitaire des mammifères et interviennent alors dans la réponse immunitaire innée. Ces peptides possèdent la capacité de tuer un large spectre de microorganismes : bactériens, viraux, fongiques ou parasitaires (Hancock et Sahl, 2006). De manière endogène ils possèdent également de nombreux rôles comme la modulation du système immunitaire en agissant comme des chimiokines, la favorisation de la cicatrisation ou encore la modulation des cellules dendritiques dans la réponse immunitaire adaptative (Andreu et Rivas, 1998 ; Levy, 2000 ; Hilchie *et al.*, 2013).

La diversité des PAM est très grande puisqu'en plus des plusieurs milliers identifiés chez tous les organismes, en allant des bactéries et des plantes aux animaux et aux humains, de nombreux autres ont été synthétisés *de novo* ou dérivés de peptides naturels afin de reproduire leur activité biologique (Blazyk *et al.*, 2001 ; Hilpert *et al.*, 2006).

Quant à leur structure, les PAM présentent plusieurs caractéristiques communes. Ainsi, les PAM sont généralement constitués d'une courte séquence d'acides aminés (entre 10 et 50 le plus souvent). De plus, les PAM riches en hélices ou feuilletts β sont fréquents. Concernant leur charge, une caractéristique largement partagée réside dans leur charge cationique et leur caractère amphiphile qui leur confèrent leur sélectivité sur la membrane bactérienne (Dathe *et al.*, 2002). Il apparaît de plus que les peptides possédant naturellement une activité antimicrobienne contiennent des patrons d'acides aminés spécifiques tels que la phénylalanine, l'arginine, le tryptophane ou encore la proline (Junkes *et al.*, 2008). Un aperçu de la structure de quelques PAM est donné sur la Figure 23.

Figure 23 : Schémas de différents PAM, naturels ou synthétiques (adapté d'après Schulze et al., 2016).

<u>Nom du peptide :</u>	<u>Séquence d'acides aminés :</u>	<u>Structure 3D :</u>
Protégrine-1 Porcine	RGGRL  CYCRR RFCVC VGRG	
LL-37 Cathélicidine humaine	LLGDF FRKSK EKIGK EFKRI VQRIK DFLRN LVPRT ES	
Magainine Grenouille	GIGKF LHS AK KFGKA FVGEI MNS-NH2	
Indolicidine Bovine	ILPWK WPWWP WRR	
Nisine Antibiotique bactérien		
c-WFW Synthétique	Cyclo-RRRWFW	

Les schémas ci-dessus représentent différentes structures peptidiques naturelles ou synthétisées. Les peptides antimicrobiens (PAM) connus sont linéaires (magainine, LL-37), cycliques (c-WFW), ou pontés par des disulfures (protégrine). Les PAM peuvent prendre la forme d'une hélice amphiphile (magainine, LL-37) ou d'une structure β (protégrine) et ont une conformation irrégulière (indolicidine) ou une amphipathicité reposant sur la séquence des acides aminés dans les structures à contrainte conformationnelle (c-WFW). Les caractéristiques communes des PAM sont leur charge cationique et leur caractère amphiphile.

Les recherches visant à accroître l'efficacité antimicrobienne des PAM se sont concentrées sur des peptides linéaires et parfois hélicoïdaux. Ont été étudiés ainsi plus particulièrement des dérivés synthétiques de la magainine (la magainine est un PAM naturel qui a été à l'origine identifié et isolé à partir des glandes muqueuses de la peau de la grenouille à griffes africaine *Xenopus laevis*) et des hexapeptides cycliques tels que le c-WWW (dont la séquence est un cycle composé de trois arginines et de trois tryptophanes) et le c-WFW (peptide cyclique composé de trois arginines, un tryptophane, une phénylalanine et un tryptophane). Ces peptides ont été choisis pour les études car ils possèdent plusieurs caractéristiques d'intérêt. Tout d'abord leur structure les rend peu vulnérables aux dégradations enzymatiques. Ensuite, ils sont de petite taille et présentent ainsi un risque limité de provoquer des réactions immunitaires. Enfin, ils possèdent un coût de synthèse limité ce qui rend leur utilisation par les entreprises de production de semence envisageable (Wessolowski *et al.*, 2004).

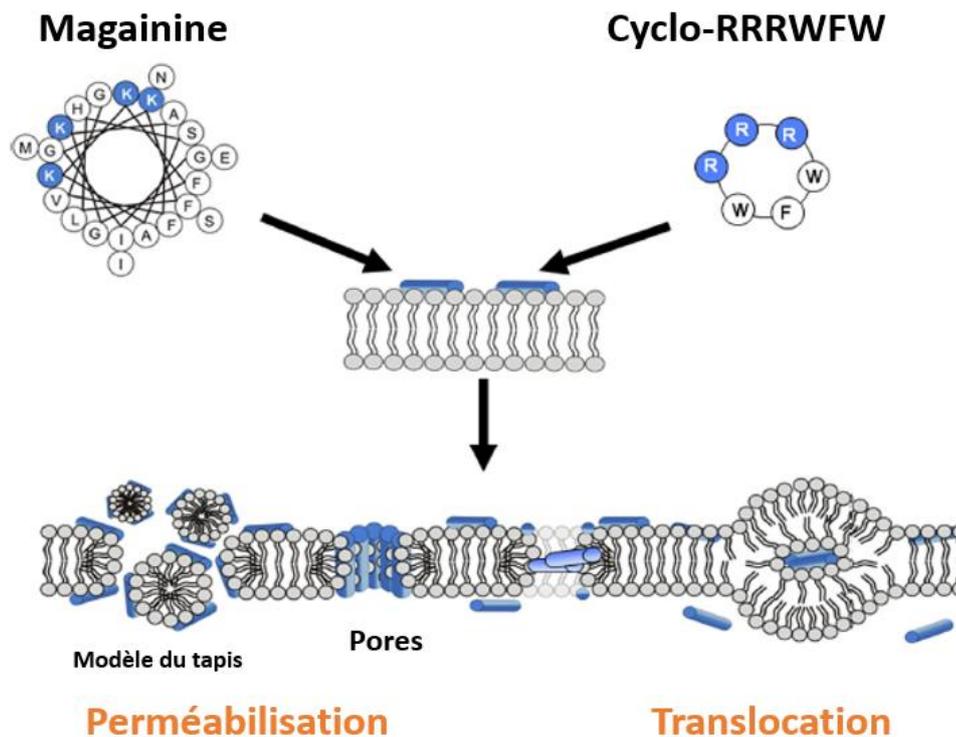
b. Mode d'action

L'action des PAM repose en particulier sur deux de leurs caractéristiques : leur charge cationique et leur caractère amphiphile, avec de plus une séparation spatiale des résidus polaires et hydrophobes. Ces caractéristiques sont en effet responsables des interactions des PAM avec les membranes bactériennes. Les PAM chargés positivement se lient avec les groupes de lipides chargés négativement des membranes bactériennes et ces liaisons sont renforcées par des interactions de Coulomb. Ensuite, la partie lipophile des PAM permet des interactions hydrophobes avec les chaînes acyl des lipides membranaires, ce qui permet ainsi aux PAM de pénétrer la bicouche lipidique des membranes bactériennes et ainsi de perturber leur fonction de barrière. Cela entraîne la perméabilisation des membranes bactériennes qui est à l'origine de la mort cellulaire (Bechinger et Lohner, 2006). Les bactéries Gram-négatives, comme par exemple les *Enterobacteriaceae* qui sont un des contaminants principaux de la semence, possèdent de plus une paroi externe supplémentaire composée entre autres de lipopolysaccharides (LPS). Les LPS sont fortement chargés négativement et permettent la liaison des PAM qui traversent ainsi la paroi pour atteindre la membrane bactérienne et agir comme précédemment décrit (Rathinakumar *et al.*, 2009).

Ainsi, la perméabilisation de la membrane bactérienne induite par les PAM conduit à la destruction du potentiel de membrane et des échanges entre les milieux intra et extracellulaire, provoquant ainsi la mort de la cellule. Certains peptides peuvent de plus se transloquer dans le cytoplasme et interférer avec divers processus intracellulaires. Ils peuvent ainsi bloquer la synthèse de protéines, de l'ADN ou encore de la paroi cellulaire (Wilmes *et al.*, 2011).

La Figure 24 représente les deux principaux modes d'action des PAM.

Figure 24 : Mode d'action des PAM, exemples de la magainine et du cyclo-RRRWWF (c-WFW) (adapté d'après Schulze et al., 2016).



Les modes d'action des peptides antimicrobiens, en prenant les exemples de la magainine et le c-WFW, sont représentés sur la figure ci-dessus. L'accumulation de peptides antimicrobiens (PAM) au niveau de la matrice lipidique bactérienne est suivie d'une insertion et d'une perturbation de la fonction de la barrière membranaire. Les PAM perméabilisent les membranes en "tapissant" la bicouche de peptides, ce qui conduit finalement à l'élimination des lipides, par association des peptides avec des canaux ou par formation de pores transmembranaires toroïdaux constitués de peptides et de lipides. La désintégration de ces pores pourrait également permettre la translocation des PAM. D'autres PAM pourraient franchir la matrice lipidique par une voie de transport encore mal comprise (translocation) et s'accumuler dans des sites distincts du cytoplasme.

Le mode d'action qui permet aux PAM de détruire efficacement les microorganismes et notamment les bactéries apparaît toutefois peu spécifique et il convient donc de se demander quels sont les effets de ces peptides sur les cellules eucaryotes. La sélectivité des PAM envers les cellules procaryotes résulte en fait dans la présence de lipides anioniques, notamment des phosphatidylglycérols et cardiolipines, et du manque de cholestérol dans leurs membranes cellulaires, permettant ainsi les interactions avec les PAM cationiques. Au contraire, la couche externe des membranes cellulaires eucaryotes est composée de lipides de charge neutre tels la phosphatidylcholine, la sphingomyéline et la phosphatidyléthanolamine. Ainsi, les interactions électrostatiques avec les PAM sont mineures. De ce fait, la cytotoxicité des PAM pour les cellules eucaryotes est très faible (Dathe *et al.*, 2002).

Cependant les interactions entre les PAM et les cellules eucaryotes, et en particulier les spermatozoïdes, ne sont pas toujours négligeables, comme le démontrent les études réalisées *in vivo* sur les PAM endogènes du système reproducteur. Les tractus génitaux

mâles et femelles contiennent en effet plusieurs protéines et peptides à l'action antimicrobienne. Il s'agit le plus souvent de β -défensines et parfois de cathelicidines, deux sortes de PAM cationiques. Ces peptides font ainsi partie intégrante du système immunitaire du tractus génital (Com *et al.*, 2003). Dans le tractus génital des mammifères mâles les β -défensines sont synthétisés principalement dans l'épididyme puis sont sécrétés dans la lumière des tubes séminifères. Ils se retrouvent finalement sur la surface des spermatozoïdes (Zanich *et al.*, 2003 ;Yenugu *et al.*, 2004 ; Zhou *et al.*, 2004). Des études ont montré que cet attachement des PAM aux spermatozoïdes possédait un rôle décisif pour la fonction spermatique (Zhou *et al.*, 2013). En effet, des expériences réalisées sur des souris KO pour les gènes codant les β -défensines du tractus génital ont montré que chez celles-ci les spermatozoïdes présentaient un taux de réactions acrosomales précoces augmenté. De plus, une désorganisation des microtubules du cytosquelette des spermatozoïdes était responsable de défauts de motilité, causant finalement l'infertilité (Colledge, 2013). Les rôles joués par les β -défensines endogènes du tractus génital mâle seraient, selon l'hypothèse la plus probable, permis par leur effet sur la régulation des chaînes calcium-dépendantes de la membrane des spermatozoïdes. Enfin, il est supposé que l'absence de dommage aux membranes des spermatozoïdes, contrairement à ce qui est observé pour les cellules procaryotes, serait dû au rôle protecteur du cholestérol que contient la membrane des cellules eucaryotes (Yenugu *et al.*, 2006).

Néanmoins, tous les PAM ne sont pas inoffensifs pour les spermatozoïdes. En effet, certains PAM du tractus génital femelle, de la famille des défensines, peuvent induire des dommages cellulaires aux spermatozoïdes et causer une perte de motilité spermatique. Il en est de même pour certains PAM exogènes pour lesquels une cytotoxicité envers les spermatozoïdes a été mise en évidence et produit un effet spermiostatique inhibant la motilité mais également spermicide (D'Cruz *et al.*, 1995).

Ainsi, il apparaît que les tractus génitaux mâles et femelles des mammifères sont dotés de PAM permettant une activité antimicrobienne. Et bien que certains, comme les β -défensines, se révèlent posséder de plus un rôle favorable sur la fonction spermatique, d'autres sont au contraire cytotoxiques pour les spermatozoïdes. De manière endogène cette cytotoxicité est évitée par une séparation spatiale et temporelle entre les spermatozoïdes et les PAM, évitant ainsi les interactions. Cependant, cette séparation n'est pas envisageable lorsque l'on prévoit l'utilisation de PAM pour la conservation des doses de semence. La cytotoxicité des PAM étudiés envers les spermatozoïdes devra donc être analysée afin de s'assurer de la faisabilité de leur utilisation. Cela est d'autant plus important que chez certaines espèces telles que le porc les membranes cellulaires des spermatozoïdes sont peu riches en cholestérol ce qui les rend d'autant plus vulnérables aux dommages causés par les PAM (Cross, 1998).

Enfin, les PAM qui sont des peptides cationiques se lient par des interactions électrostatiques aux composants anioniques du LPS et peuvent être utilisés en association avec des antibiotiques conventionnels afin de préparer et d'accélérer les attaques et les translocations des agents antimicrobiens lipophiles ou amphiphiles qui sont employés

concomitamment (Vaara et Porro, 1996). Plusieurs études ont été menées afin d'étudier les interactions entre les PAM et les antibiotiques conventionnels.

Les interactions entre différentes sortes de peptides, comme par exemple entre des peptides antimicrobiens et des antibiotiques conventionnels, sont un phénomène bien connu en microbiologie (Darveau *et al.*, 1991). Ainsi, plusieurs protéines possédant des propriétés antimicrobiennes, comme la lactoferrine, le lysozyme ou la polymyxine, sont connues pour perméabiliser la paroi externe des bactéries Gram-négatives et réduisent ainsi les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques qui sont utilisés conjointement. Cet effet est par exemple exploité dans l'association Polymyxine B – Néomycine contenue dans plusieurs formulations d'antibiotiques du commerce (Vaara et Porro, 1996 ; Schulze *et al.*, 2016) .

Ainsi, Darveau *et al.* (1991) ont démontré que l'association de Cefepime (une molécule antibiotique de la famille des β -lactamines) et de Magainine 2 présentait une activité antibactérienne plus importante que la Cefepime seule.

De même, Vaara et Porro (1996) se sont intéressés à d'autres groupes de peptides antimicrobiens et ont montré que le peptide synthétique KFFKFFKFF (un peptide composé de plusieurs résidus de lysine (K), un acide aminé cationique, et de phénylalanine (F) qui est hydrophobe) sensibilisait les bactéries Gram-négatives à l'action des antibiotiques hydrophobes et amphiphiles. Il permettait ainsi de réduire la CMI de la rifampicine d'un facteur 300 pour certaines souches d'*Escherichia coli*. Cependant, cette action synergique n'était pas observée pour tous les PAM. Ainsi, les peptides KEKEKEKEKE et KKKKKKFLFL (E : Acide Glutamique, L : Leucine) ne présentaient pas de synergie avec les antibiotiques testés (rifampicine, érythromycine, norfloxacin et tobramycine).

Enfin, des interactions synergiques entre différentes classes de PAM sont également possibles. Kobayashi *et al.* (2001) ont ainsi étudié les interactions entre deux PAM : la magainine 2 (MG2) (PAM possédant une structure en hélice α) et la tachyplésine I (T-SS) (PAM isolé à partir d'hémolymphe de crabe des neiges et possédant une structure cyclique composée de feuilletts β). La MG2 et la T-SS ont présenté un important effet synergique à la fois contre les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif. Ainsi, cette étude mettait en avant la possibilité que représentait le développement de cocktails thérapeutiques composés de différentes combinaisons de PAM.

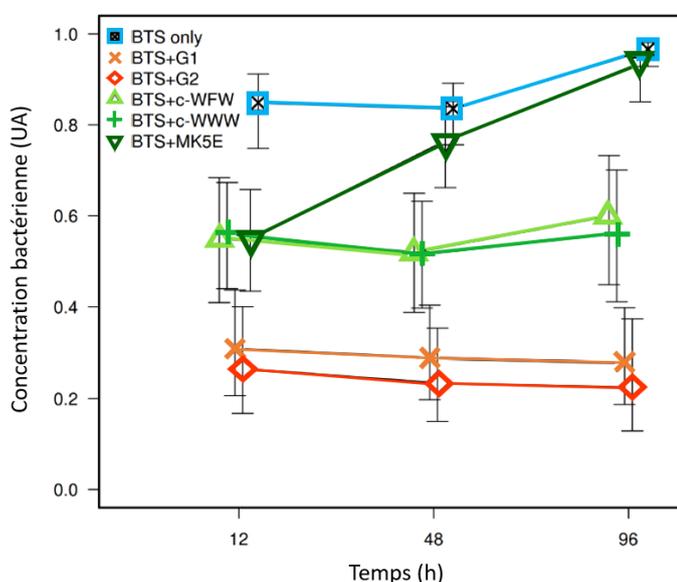
c. Efficacité

L'étude de Speck *et al.* (2014) avait pour objectif d'évaluer le potentiel antimicrobien des PAM dans des doses de semence porcine conservées sous forme fraîche réfrigérée. Ainsi les auteurs se sont intéressés en particulier à l'activité antibactérienne de deux peptides cationiques cycliques (c-WWW, c-WFW) et un peptide cationique hélicoïdal analogue de la magainine II (MK5E). Deux expériences ont alors été réalisées. La première afin de déterminer l'activité antibactérienne *in vitro* du c-WFW, du c-WWW et du MK5E. La seconde avait pour but de déterminer l'effet potentialisateur de ces PAM sur l'activité antibiotique de la gentamicine.

La première expérience consistait ainsi à déterminer l'activité antibactérienne du c-WWW, du c-WFW et du MK5E et de la quantifier en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice de chacun des peptides pour différentes souches bactériennes (souches de bactéries en grande majorité à Gram négatif : souches d'*Escherichia coli*, d'*Enterobacter*, de *Klebsiella pneumoniae*, et de *Proteus* ; et deux souches de bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*). Ces données étaient ensuite comparées à l'activité antibiotique de la gentamicine à la concentration 250 mg/L, antibiotique classiquement utilisé pour la conservation des doses de semence et pris ici comme référence.

La première observation a été que les trois peptides étaient efficaces pour réduire la croissance bactérienne de 11 des 13 souches bactériennes testées. La limitation de la croissance bactérienne obtenue avec ces trois PAM était toutefois moindre que celle obtenue par l'ajout de gentamicine. De plus, seules les souches de *Proteus* (*Proteus myxofaciens* et *Proteus vulgaris*) se sont révélées insensibles aux effets des trois PAM. Les résultats de cette expérience sont représentés sur la Figure 25.

Figure 25 : Concentration bactérienne dans la semence traitée par de la gentamicine ou des PAM en fonction du temps (adapté d'après Speck et al., 2014).



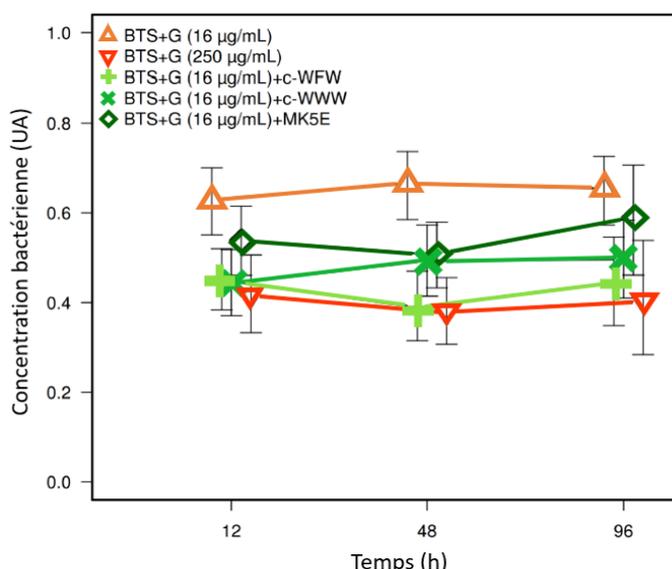
Légende : BTS only : échantillons de semence contenant uniquement du diluant BTS (Beltsville Thawing Solution, diluant standard pour la semence porcine). BTS G1 et G2 : échantillons de semence contenant du diluant BTS et 250 mg/L de gentamicine. BTS+c-WFW : échantillons de semence contenant du diluant BTS et 4 μM de c-WFW. BTS+c-WWW : échantillons de semence contenant du diluant BTS et 2 μM de c-WWW. BTS+MK5E : échantillons de semence contenant du diluant BTS et 1 μM de MK5E. L'axe des ordonnées est une représentation de la méthode non paramétrique utilisée pour évaluer la concentration bactérienne dans les échantillons. Ainsi, plus la valeur est élevée plus la valeur de CFU/mL est importante et donc moins le traitement est efficace.

Ainsi, la plus grande efficacité sur la réduction de la croissance bactérienne était observée pour le c-WFW suivi du c-WWW et du MK5E. Cependant, bien que le MK5E

présentait une efficacité proche des deux autres peptides au début de l'expérience, il se révélait aussi peu efficace que le diluant seul après un temps de conservation de 96 h. De plus, pour le c-WWW et le MK5E, les CMI se révélaient supérieures aux doses cytotoxiques déterminées pour ces peptides (Schulze *et al.*, 2014). Ainsi, il ne serait pas envisageable d'employer le c-WWW ou le MK5E seuls pour le traitement antibiotique des doses de semence. Ce constat a donc motivé la réalisation de la seconde expérience qui consistait en l'évaluation de l'effet potentialisateur de ces deux peptides sur l'activité antibiotique de la gentamicine.

Dans la seconde expérience les auteurs ont comparé l'efficacité de mélanges de gentamicine et de PAM (c-WFW, c-WWW ou MK5E) à celle de la gentamicine seule. Ils ont ainsi démontré que l'ajout de 4 μM de c-WFW, de 2 μM de c-WWW ou de 1 μM de MK5E à une solution contenant de la gentamicine résultait dans des valeurs de CMI proches de celles obtenues avec la gentamicine seule. La différence résidait dans le fait que la gentamicine était dosée à la concentration de seulement 16 mg/L lorsqu'elle était associée aux PAM contre 250 mg/L lorsqu'elle était utilisée seule. Les auteurs ont alors conclu que la combinaison de la gentamicine et du c-WFW ou du c-WWW (et dans une moindre mesure du MK5E) améliore son efficacité antibiotique *in situ*. Les résultats obtenus au cours de cette expérience sont présentés sur la Figure 26.

Figure 26 : Concentration bactérienne dans la semence traitée par de la gentamicine ou des associations de gentamicine et de PAM en fonction du temps (adapté d'après Speck *et al.*, 2014).

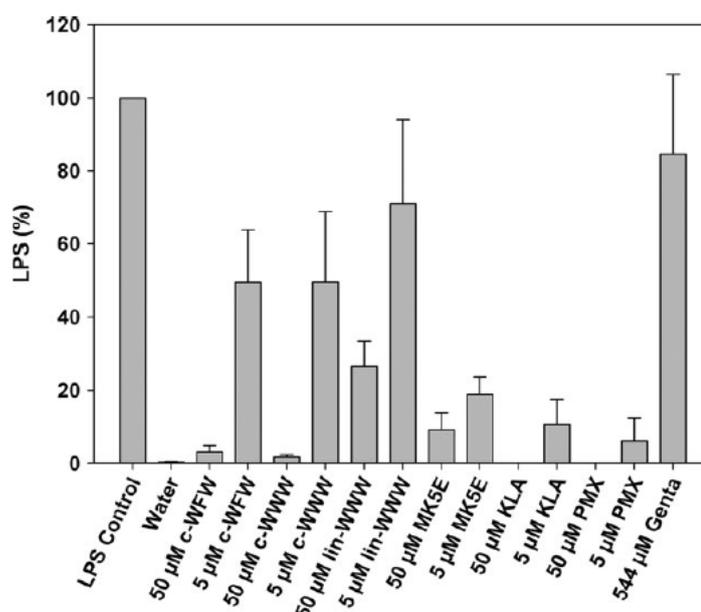


Pour conclure, les résultats de cette étude montrent que, bien que les PAM n'offrent pas une alternative complète à l'utilisation des antibiotiques traditionnels, ils pourraient permettre une réduction substantielle de la concentration d'antibiotiques utilisés pour la conservation de la semence (Speck *et al.*, 2014).

Durant les dernières années d'autres familles de PAM ont été étudiées. Ainsi, Bussalleu *et al.* (2016) ont étudié l'utilisation du peptide antimicrobien riche en proline-arginine, PR-39, qui appartient au groupe des peptides antimicrobiens myéloïdes porcins 36 (PMAP-36) et 37 (PMAP-37), comme additif aux diluants de la semence porcine. Les auteurs ont observé que les peptides du groupe PMAP-37 à des concentrations de 0,5, 1 et 3 μM réduisaient la charge bactérienne jusqu'à 10 jours, en plus d'améliorer la viabilité des spermatozoïdes. De plus, le PR-39 (20 μM) favorisait l'inhibition de la croissance bactérienne, mais il s'est cependant avéré cytotoxique pour les spermatozoïdes porcins. D'autres peptides d'origine porcine tels que la bêta-défensine-1 (PBD-1) et la bêta-défensine-2 (PBD-2) pourraient être envisagés pour être utilisés comme agents antimicrobiens. Puig-Timonet *et al.* (2018) ont constaté que les deux peptides, à une concentration de 3 mM, ne nuisaient pas à la viabilité et à la motilité des spermatozoïdes et étaient capables de contrôler la croissance microbienne dans une certaine mesure (Santos et Silva, 2020).

Enfin, un autre effet protecteur des PAM mis en évidence pourrait présenter un intérêt dans la conservation de la semence : les PAM seraient capables de neutraliser les LPS (Schulze *et al.*, 2015b). Or, il est connu que les bactéries Gram-négatif libèrent des LPS qui agissent comme des endotoxines et exercent une activité spermicide (Hakimi *et al.*, 2006). Une étude récente a montré que les LPS se fixaient à la région de la tête des spermatozoïdes, diminuaient leur motilité et provoquaient leur apoptose (Okazaki *et al.*, 2010). Schulze *et al.* (2015b) ont alors étudié la neutralisation des LPS par différents peptides antimicrobiens : le c-WFW, le c-WWW et le MK5E. Ils ont alors constaté que les LPS étaient neutralisés de façon différente selon les PAM et que cet effet neutralisant était concentration-dépendant. Les résultats montrent que l'ajout de 50 μM de c-WWW ou de c-WFW dans une dose de semence porcine permettait de neutraliser presque en totalité 50 UE/mL de LPS O55:B5 d'*E. coli*. Au contraire, 544 μM de gentamicine (soit une concentration de 250 mg/L, concentration habituellement utilisée pour la conservation du sperme de verrat) ne permettaient pas de neutraliser les LPS. Les résultats de cette expérience sont présentés à la Figure 27.

Figure 27 : Potentiel de neutralisation du LPS par différents peptides antimicrobiens et par la gentamicine (adapté d'après Schulze et al., 2015b).



Potentiel de neutralisation du LPS (en %) par différents peptides antimicrobiens et par la gentamicine. Pour les expériences, 200 µl d'échantillons de peptides (aux concentrations de 5 µM et 50 µM) ont été incubés avec 50 EU/ml d'endotoxine O55:B5 d'E. coli à 23°C pendant 30 minutes. Après l'incubation, un volume de 100 µl d'échantillon a été analysé avec le kit de test LAL-Kinetic-QCL (Lonza) selon les spécifications du fabricant.

Ces résultats renforcent dès lors le rôle prometteur que pourrait avoir les PAM pour la conservation des doses de semence.

d. Effets sur la semence

Les PAM ont démontré posséder des propriétés antibactériennes intéressantes pour le traitement et la conservation de la semence. Néanmoins, avant de pouvoir envisager de les utiliser comme traitements adjuvants des doses de semence il convient d'étudier leurs potentiels effets secondaires sur les spermatozoïdes et ainsi sur la qualité de la semence.

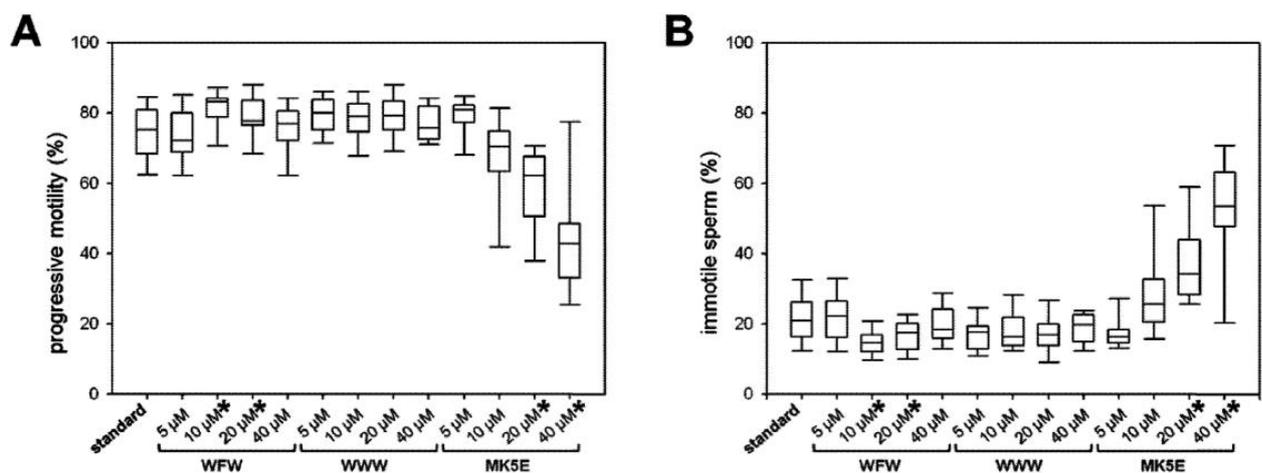
Dans une étude réalisée en 2014, *Schulze et al.* ont réalisé plusieurs expériences afin de déterminer l'effet de l'utilisation des PAM sur la semence.

La première expérience avait pour objectif d'étudier les effets à court terme des PAM sur la motilité des spermatozoïdes. Pour cela l'expérience consistait à évaluer la motilité de spermatozoïdes porcins provenant de doses de semence incubées à 38°C pendant 5 min avec différentes concentrations de c-WFW, c-WWW ou MK5E (5 mM, 10 mM, 20 mM et 40 mM). Les concentrations utilisées dans cette expérience ont été choisies afin d'être proches des CMI déterminées précédemment (*Dathe et al.*, 2004, 2001; *Junkes et al.*, 2008). Des spermatozoïdes provenant de doses contenant un mélange de diluant BTS et de gentamicine à la concentration de 250 mg/L (mélange classiquement utilisé pour la conservation de la semence) ont été utilisés comme témoins. La motilité des

spermatozoïdes a été évaluée par la méthode CASA (Computed Assited Sperm motility Analysis). Les résultats de cette expérience mettent en évidence que les effets des PAM sur la motilité spermatique sont concentration-dépendants et différents, voire opposés, selon le PAM. Ainsi, le c-WFW et le MK5E exercent des effets opposés sur la motilité spermatique. L'ajout de 20 μM et 40 μM de MK5E diminue significativement la proportion de spermatozoïdes motiles tandis que l'ajout de 10 μM et 20 μM de c-WFW augmente cette proportion. De même, la proportion de spermatozoïdes immobiles était augmentée par l'utilisation de MK5E tandis qu'elle était diminuée par le c-WFW. Enfin, il n'y avait pas de changement significatif de ces paramètres lors de l'utilisation de c-WWW. Ces résultats sont représentés sur la Figure 28.

De plus, le c-WFW induit une diminution significative de l'amplitude de déplacement latéral de la tête des spermatozoïdes (ALT), une fréquence de battements croisés (FBC) significativement plus élevée, une proportion de motilité linéaire des spermatozoïdes significativement plus élevée et une proportion de spermatozoïdes hyperactifs plus faible. Ces effets étaient de plus observés dès une concentration de 10 μM de ce peptide. Concernant le c-WWW il exerçait quant à lui une augmentation de la FBC pour toutes les concentrations testées et une diminution de l'ALT à la concentration de 5 μM . Enfin, le MK5E augmentait significativement l'ALT pour des concentrations de 5 et 20 μM . La proportion de spermatozoïdes hypermotiles était de plus significativement augmentée pour les concentrations de 5, 10 et 20 μM . L'ensemble de ces résultats sont présentés sur la Figure 29.

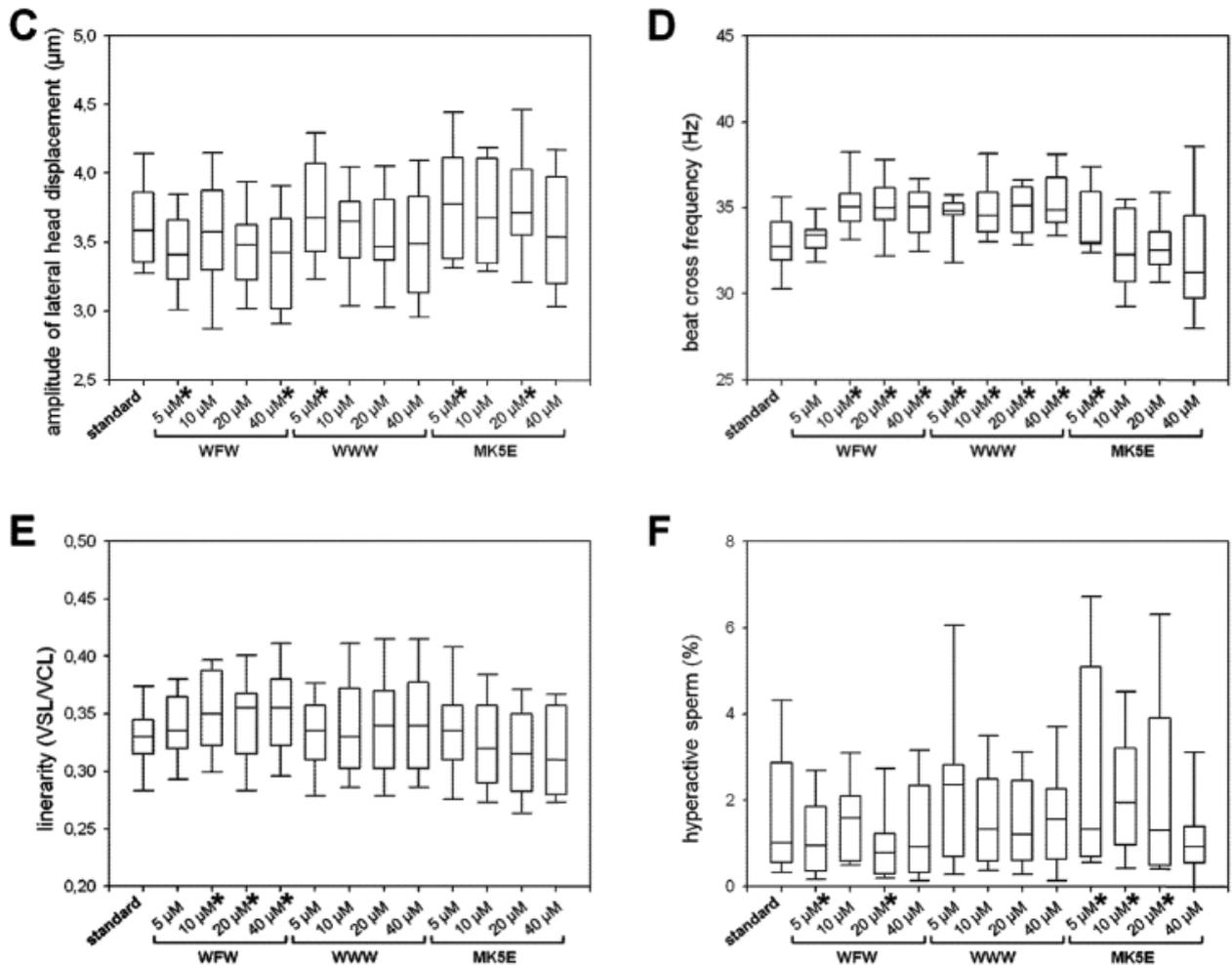
Figure 28 : Paramètres de mobilité spermatique (motilité progressive (A) et pourcentage de spermatozoïdes non motiles (B)) après 5 minutes d'incubation des doses de semence avec des concentrations croissantes (5, 10, 20 et 40 μM) de c-WFW, c-WWW et MK5E (Schulze et al., 2014)



Légende : Standard = Témoin = diluant BTS + 250 mg/L de gentamycine.

* : Différence significative ($p < 0,05$) avec le témoin.

Figure 29 : Paramètres de mobilité spermatique (amplitude de déplacement latéral (C), fréquence de battements croisés (D), linéarité de déplacement (E) et pourcentage de spermatozoïdes hypermotiles (F)) après 5 minutes d'incubation des doses de semence avec des concentrations croissantes (5, 10, 20 et 40 μM) de c-WFW, c-WWW et MK5E (Schulze et al., 2014) (continuation).



Légende : Standard = Témoin = diluant BTS + 250 mg/L de gentamycine.

* : Différence significative ($p < 0,05$) avec le témoin.

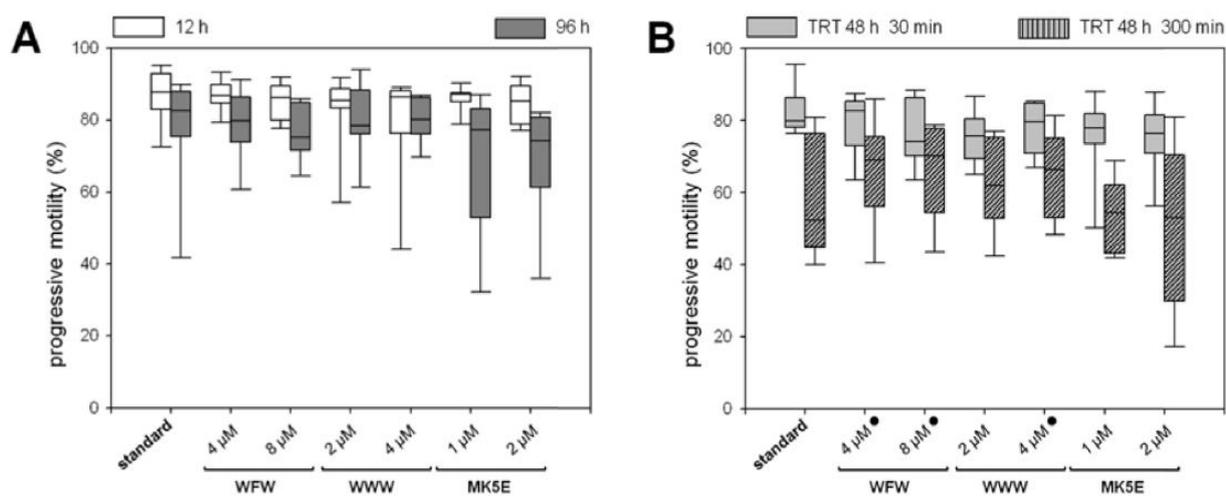
L'objectif de la seconde expérience était d'évaluer les effets des PAM sur la qualité de la semence au cours de sa conservation. Ainsi, en s'appuyant sur les résultats de la première expérience, les auteurs ont étudié les effets du c-WFW aux concentrations de 4 et 8 μM et ceux du c-WWW aux concentrations de 2 et 4 μM . En raison de ses effets délétères sur la motilité spermatique, le MK5E a été étudié aux concentrations de 1 et 2 μM seulement.

Le premier paramètre mesuré dans les échantillons analysés a été la contamination bactérienne. Celle-ci s'est révélée négative pour l'ensemble des échantillons des différents peptides.

Ensuite, plusieurs paramètres étaient mesurés pour évaluer la motilité spermatique (proportion de motilité progressive, vitesse moyenne sur la trajectoire, linéarité de la trajectoire et pourcentage de spermatozoïdes présentant des dommages cytologiques) après 12 et 96 h de conservation. Les mêmes paramètres ont également été mesurés après deux tests à la résistance thermique (TRT) (TRT : incubation durant 30 min ou 300 min à 38°C) réalisés après 48 h de conservation, dans le but d'évaluer la viabilité des spermatozoïdes dans des conditions similaires à celles du tractus génital de la truie. Le témoin utilisé durant ces expériences était des doses de semences conservées avec du diluant BTS et de la gentamicine à la concentration de 250 mg/L.

Les résultats de ces expériences révèlent que les échantillons supplémentés en c-WFW et c-WWW présentent la stabilité la plus élevée, avec une motilité spermatique même supérieure à celle du témoin après un TRT de 300 min. Cependant, contrairement aux hexapeptides, le MK5E induit la plus faible motilité spermatique. De plus, alors que la plus forte proportion de spermatozoïdes immobiles est obtenue dans les échantillons contenant du MK5E, cette proportion est la plus faible dans les échantillons contenant du c-WFW à la concentration de 8 µM. Les mêmes observations sont réalisées après 96 h de conservation. Les résultats sont présentés sur la Figure 30. Le c-WFW est donc le PAM étudié réduisant le moins la motilité spermatique.

Figures 30 : Motilité spermatique progressive après conservation à 16°C durant 12 ou 96 h (A) ou après un TRT de 30 ou 300 min (B) des doses de semence contenant des concentrations de 4 µM et 8 µM de c-WFW, 2 µM et 4 µM de c-WWW, et 1 µM et 2 µM de MK5E (Schulze et al., 2014)



Légende : Standard = Témoin = diluant BTS + 250 mg/L de gentamicine.

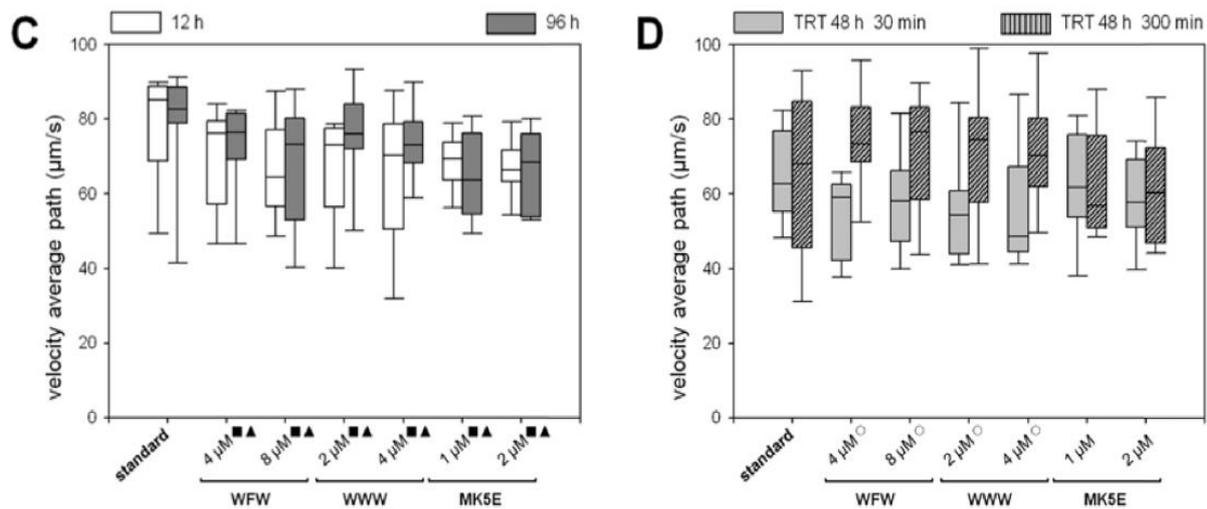
TRT : test de thermorésistance.

Différence significative ($p < 0,05$) avec le témoin après 12 h (■), après 48 h (#) et après 96 h (▲) de conservation. Différence significative ($p < 0,05$) avec le témoin après le TRT de 30 min (○) ou de 300 min (●).

Les expériences suivantes ont montré que tous les PAM engendraient une réduction de la vitesse moyenne sur la trajectoire (VMT) après 12 et 96 h de stockage, en comparaison

avec le témoin. Néanmoins, après un TRT de 300 min cet effet était réversible et une récupération de la VMT était observée dans les échantillons supplémentés en hexapeptides. Cette récupération n'est pas observée pour le MK5E (Figure 31).

Figure 31 : Vitesse moyenne sur la trajectoire des spermatozoïdes après conservation à 16°C durant 12 ou 96 h (C) ou après un TRT de 30 ou 300 min (D) des doses de semence contenant des concentrations de 4 µM et 8 µM de c-WFW, 2 µM et 4 µM de c-WWW, et 1 µM et 2 µM de c-WWW, et 1 µM et 2 µM de MK5E (Schulze et al., 2014).

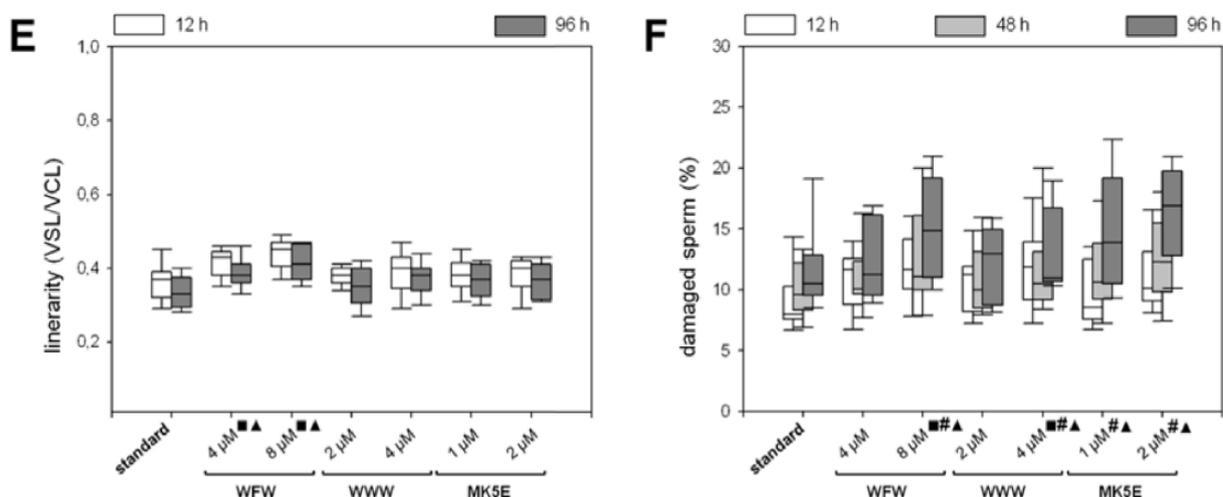


Légende : Standard = Témoin = diluant BTS + 250 mg/L de gentamycine.
TRT : test de thermorésistance.

Différence significative ($p < 0,05$) avec le témoin après 12h (■), après 48h (#) et après 96h (▲) de conservation. Différence significative ($p < 0,05$) avec le témoin après le TRT de 30 min (○) ou de 300 min (●).

Enfin, les échantillons supplémentés en hexapeptides présentait une proportion de spermatozoïdes avec une motilité linéaire plus importante après 12 et 96 h de conservation, en comparaison avec le témoin. Cet effet était d'autant plus marqué avec le c-WFW. Le MK5E n'avait pas d'effet sur la motilité linéaire. De plus, la proportion de spermatozoïdes hyperactifs est significativement réduite par les hexapeptides après 12 et 96 h de conservation. Enfin, concernant la morphologie des spermatozoïdes, une étude par cytométrie de flux a mis en évidence que le taux de dommages aux membranes et aux acrosomes des spermatozoïdes était plus faible dans les échantillons supplémentés en hexapeptides que dans ceux contenant du MK5E. De même, la proportion de spermatozoïdes présentant une crête apicale normale était identique dans les échantillons témoins et ceux supplémentés en hexapeptides tandis qu'elle était plus faible dans ceux contenant du MK5E (Figure 32).

Figure 32 : Motilité spermatique linéaire après conservation à 16°C durant 12 ou 96 h (E) ou après un TRT de 30 ou 300 min (F) des doses de semence contenant des concentrations de 4 µM et 8 µM de c-WFW, 2 µM et 4 µM de c-WWW, et 1 µM et 2 µM de MK5E (Schulze et al., 2014).



Légende : Standard = Témoin = diluant BTS + 250 mg/L de gentamycine.

TRT : test de thermorésistance.

Différence significative ($p < 0,05$) avec le témoin après 12h (■), après 48h (#) et après 96h (▲) de conservation. Différence significative ($p < 0,05$) avec le témoin après le TRT de 30 min (○) ou de 300 min (●).

Enfin, les auteurs ont réalisé une évaluation *in vivo* de la qualité de la semence et particulièrement de sa fertilité. Ainsi, des taux de fertilité similaires ont été obtenus pour des IA avec des doses de semences contenant 4 µM de c-WFW et 160 mg/L de gentamicine que pour des doses ayant une concentration de 250 mg/L de gentamicine (témoin) (Tableau 19).

Tableau 19 : Fertilité obtenue avec de la semence diluée par du diluant BTS complétement de 250 mg/L de gentamicine ou de 160 mg/L de gentamicine + 4 µM c-WFW (d'après Schulze et al., 2014).

	Truies ^a (n)	Taux de mise-bas ^b (%)	Porcelets nés (moyenne ± SD)		
			Total ^b	Vivants ^b	Mort-nés ^b
Témoin	40	90,0	11,5 ± 4,9	10,2 ± 4,7	1,3 ± 0,7
Peptide	40	87,5	11,7 ± 5,1	10,4 ± 4,8	1,3 ± 0,7

Légende : Témoin = diluant BTS + 250 mg/L de gentamycine (concentration finale dans les doses de semence).

^a2 inséminations par truies étaient pratiquées avec 2x10⁹ spermatozoïdes par dose.

^bDifférences non significatives ($p > 0,05$)

Chez l'Homme, les effets du peptide anti-microbien « β -défensine 1 » sur la motilité et la viabilité des spermatozoïdes post-traitement de la semence ont été évalués. Ainsi, les études montrent que l'ajout de ce peptide à la semence permet une augmentation de la motilité et de la viabilité spermatique (Diao *et al.*, 2014 ; Zupin *et al.*, 2019) en comparaison avec de la semence n'en contenant pas, ou un maintien des qualités initiales des spermatozoïdes, après séparation du liquide séminal, contrairement aux doses ne contenant pas ce peptide (Zupin *et al.*, 2019 ; Khayamabed *et al.*, 2020).

Pour conclure, les effets des PAM sur la semence sont concentration-dépendants. De plus, le c-WFW a révélé avoir un effet positif sur la mobilité spermatique globale et sur la motilité linéarité. Le c-WWW est quant à lui neutre pour la motilité spermatique tandis que le MK5E présente des effets négatifs, en particulier aux concentrations les plus élevées. Les effets du c-WFW (à la concentration de 4 μ M) et du c-WWW (à la concentration de 2 μ M) sont compatibles avec leur utilisation pour la conservation sous forme liquide de la semence de verrats. De plus, le c-WFW (4 μ M) a un impact positif sur le taux de motilité progressive et linéaire et améliore la longévité de la semence tout en n'altérant pas la fertilité *in vivo*, en comparaison avec des doses de semence conservées de manière habituelle. Ces résultats sont de plus cohérents avec les données préexistantes chez l'Homme mettant en évidence une augmentation de la motilité et de la viabilité spermatiques lors de l'ajout de PAM β -défensine 1 à la semence.

Par conséquent, les hexapeptides cycliques, et particulièrement le c-WFW, sont des candidats à tester pour leur potentiel antimicrobien *in situ* en tant qu'alternative ou complément aux antibiotiques conventionnels dans la conservation du sperme de verrat (Schulze *et al.*, 2014). Enfin, des études supplémentaires seront nécessaires pour évaluer l'utilisation potentielle des PAM pour le traitement de la semence de d'autres espèces.

e. Résistance bactérienne aux peptides antimicrobiens

Lors du développement d'un nouveau traitement antimicrobien il est important d'en étudier la fiabilité et la sécurité d'emploi. Dans cet objectif, plusieurs études ont été menées afin d'évaluer les risques d'existence et de développement de résistances antibactériennes aux PAM.

Il a été démontré que seul un petit nombre de bactéries sont résistantes aux PAM (Brodgen, 2005). Néanmoins, certains mécanismes mis en œuvre par les bactéries pourraient laisser craindre l'apparition de nouvelles résistances. En effet, les bactéries sont capables de modifier la liaison des PAM avec leur membrane, leur insertion ainsi que la perméabilité des membranes. Pour cela les bactéries modifient leurs membranes externes, notamment par l'ajout de charges positives aux composants des LPS et des phospholipides membranaires (Gunn, 2001 ; Peschel, 2002a). Ces mécanismes tendent ainsi à réduire la réceptivité aux PAM et leur capacité de perméabilisation. Cependant, il est à noter que face à ces mécanismes, l'activité antimicrobienne des PAM dépend fortement du micromilieu. Ainsi, il a été démontré que dans un milieu contenant du NaHCO_3 , afin de reproduire un milieu proche de celui de l'organisme, l'efficacité des PAM était significativement supérieure à celle dans un milieu composé uniquement de solution saline (Dorschner *et al.*, 2006).

D'autres mécanismes peuvent rendre les bactéries moins sensibles aux PAM, comme la production de protéases, le transport actif des PAM vers le milieu extérieur par des pompes d'efflux membranaires ou encore la formation de biofilms (Nikaido, 1996 ; Schmidtchen *et al.*, 2002 ; Otto, 2006).

Il convient néanmoins de nuancer l'importance de ces possibles mécanismes de défense des bactéries envers les PAM. En effet, la membrane bactérienne, qui est le principal lieu d'action des PAM, subit généralement peu de changements en raison de sa participation à la production d'un gradient ionique. Ainsi, un changement dans sa composition lipidique engendrerait également une modification du métabolisme énergétique de la bactérie qui lui serait néfaste. Cela limiterait donc le développement de résistances contre les PAM (Schulze *et al.*, 2016).

Enfin, en 2006, une étude avec le pexiganan, un analogue de la magainine, a rapporté pour la première fois que la résistance peut évoluer lorsque les populations bactériennes sont constamment exposées à des niveaux élevés de PAM (Perron *et al.*, 2006).

Pour conclure, de telles études soulèvent donc des questions sur la sécurité d'emploi des PAM et leur introduction dans la pratique. Cependant, à l'heure actuelle, l'échelle de temps pour le développement de pathogènes résistants ne peut pas être prédit (Schulze *et al.*, 2016).

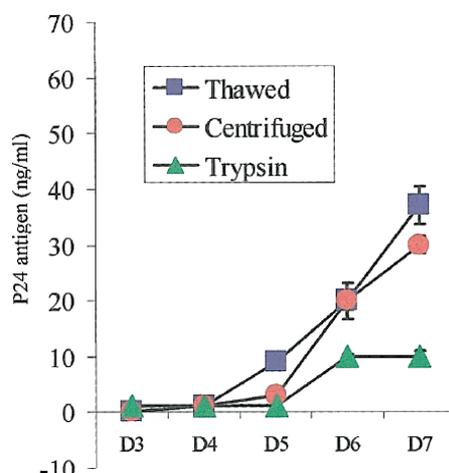
I. La trypsine

Une étude a décrit une technique pour inactiver les virus présents dans la semence par l'ajout de trypsine. Cette étude a consisté à traiter du sperme de taureau contaminé par le BHV-1 (10^3 – 10^4 TCID₅₀/mL) avec de la trypsine à 0,30 % pendant 5 à 10 minutes. Les résultats montraient alors qu'aucune particule virale n'était isolée à partir des échantillons traités par de la trypsine, en comparaison au témoin non traité (Bielanski *et al.*, 1988). Toutefois, une étude plus récente a mis en évidence des dommages causés aux membranes des spermatozoïdes par l'ajout de trypsine à 0,30 %. De même, la motilité fléchante des spermatozoïdes était diminuée par le traitement à la trypsine. Cette étude recommandait donc l'utilisation de trypsine à 0,25 % pour le traitement antiviral de la semence (Silva *et al.*, 1999).

Chez l'Homme, une méthode combinant l'utilisation de la trypsine à la concentration de 0,25 % et la technique de centrifugation par triple gradient de densité s'est révélée efficace pour réduire la charge virale en VIH-1 et en virus de l'hépatite C à des titres infectieux en-dessous du seuil clinique (Figure 33). De plus, l'étude ne rapportait pas de dommage causé aux spermatozoïdes par l'utilisation de cette méthode. Il n'y avait en particulier pas de différence significative de motilité et de viabilité des spermatozoïdes des échantillons de semence traités par la trypsine-centrifugation triple gradient en comparaison du témoin. Enfin, les capacités de fécondation des spermatozoïdes de la semence traitée

par la trypsine ont été évaluées par le calcul du taux de gestation et étaient identiques à celle du témoin (Loskutoff *et al.*, 2005).

Figure 33 : Infectiosité du VIH-1 après une brève exposition (1 min) à la trypsine concentrée à 0,25 %, mesurée par la production de l'antigène p24 (indicateur de la réplication du VIH-1) (Loskutoff *et al.*, 2005).



Légende : Thawed = témoin = échantillons de semence ayant reçu le traitement standard, sans procédure supplémentaire. Centrifuged = Centrifugé = échantillons de semence ayant été ultracentrifugés uniquement. Trypsin = échantillons de semence ayant été ultracentrifugés et traités à la trypsine. D = day = jours de conservation.

J. Acidification transitoire

Une méthode qui pourrait s'avérer efficace pour le traitement de la semence contre certains virus est la technique d'acidification transitoire. En effet, il a été démontré que la plupart des virus, à l'exception des Adénovirus et des Entérovirus, sont inactivés à un pH compris entre 5 et 6 (Fenner *et al.*, 1987). Le virus de la FCO peut ainsi être inactivé en moins d'une minute à un pH inférieur à 6 tandis que le virus de la Fièvre aphteuse perd rapidement son infectiosité à pH 5 (Bielanski, 2007). Ainsi, partant du postulat qu'une acidification transitoire de la semence permettrait d'inactiver les virus pH-labiles qu'elle contient, Bielanski *et al.* (1991) ont réalisé une étude afin d'évaluer l'impact sur la qualité de la semence et la capacité de fécondation des spermatozoïdes ayant subi une procédure d'acidification transitoire. Pour cela les auteurs ont comparé différentes caractéristiques d'échantillons de semence de taureaux dilués dans du BTS puis acidifiés transitoirement à pH 5 pendant 2 ou 5 min avant congélation avec celles d'échantillons dilués au BTS et congelés. Les résultats mettaient alors en évidence une discrète baisse de la motilité spermatique après une acidification transitoire de 5 min, mais pas après une acidification de seulement 2 min. Il n'y avait de plus pas de différence significative d'intégrité de l'acrosome entre les spermatozoïdes non traités et les spermatozoïdes acidifiés transitoirement pendant 2 ou 5 min. Enfin, concernant les capacités de fécondation des spermatozoïdes soumis à une acidification transitoire, les auteurs ont comparé leur taux de fécondation obtenu en insémination artificielle avec celui d'échantillons non acidifiés (témoin). Ainsi, Bielanski *et*

al. (1991) n'ont pas observé de différence significative de taux de fécondation entre les échantillons témoins et les échantillons acidifiés durant 2 ou 5 min, ce qui leur a permis de conclure que la procédure ne dégradait pas les capacités de fécondation des spermatozoïdes.

Toutefois, bien que cette technique semble efficace et utilisable pour le traitement antiviral de la semence, davantage d'études seront nécessaires pour compléter ces résultats.

K. Inactivation photodynamique et photo-immuno-inactivation

a. Inactivation photo-dynamique

Teles *et al.* (2018) ont récemment présenté une méthode innovante pour inactiver un virus, l'herpesvirus bovin de type 1 : l'inactivation photodynamique.

L'inactivation photodynamique (IPD) est une technique qui repose sur l'effet combiné de trois facteurs sur l'objet biologique traité : un composé photoactif (photosensibilisateur (PS)), une lumière visible ou proche de l'infrarouge et l'oxygène moléculaire.

En outre, l'effet sur la cible biologique résulte de deux types de réactions : les réactions de type I et II. Dans cette étude les photosensibilisateurs utilisés sont des porphyrines.

Réaction de type I :

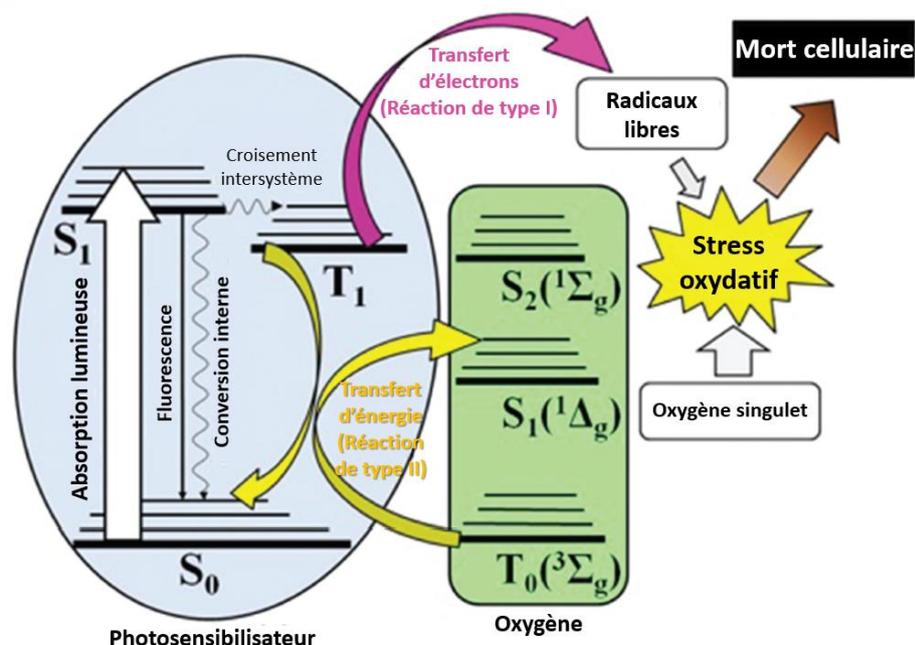
L'absorption d'un photon par le photosensibilisateur provoque son passage de l'état fondamental (S₀) à l'état singlet électroniquement excité (S₁) à partir duquel il peut passer à l'état triplet excité (T₁) ou se relaxer à l'état S₀ par fluorescence ou conversion interne (Figure 34). Lorsqu'il est dans son état S₁ ou T₁ le photosensibilisateur peut réaliser des réactions de transfert de charge avec l'oxygène moléculaire, ce qui provoque la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que les anions superoxydes et les radicaux ioniques.

Réaction de type II :

Les molécules de PS se trouvant à l'état T₁ peuvent également transférer de l'énergie à l'oxygène moléculaire ce qui entraîne la formation de son état excité singlet : l'oxygène singlet (Figure 34).

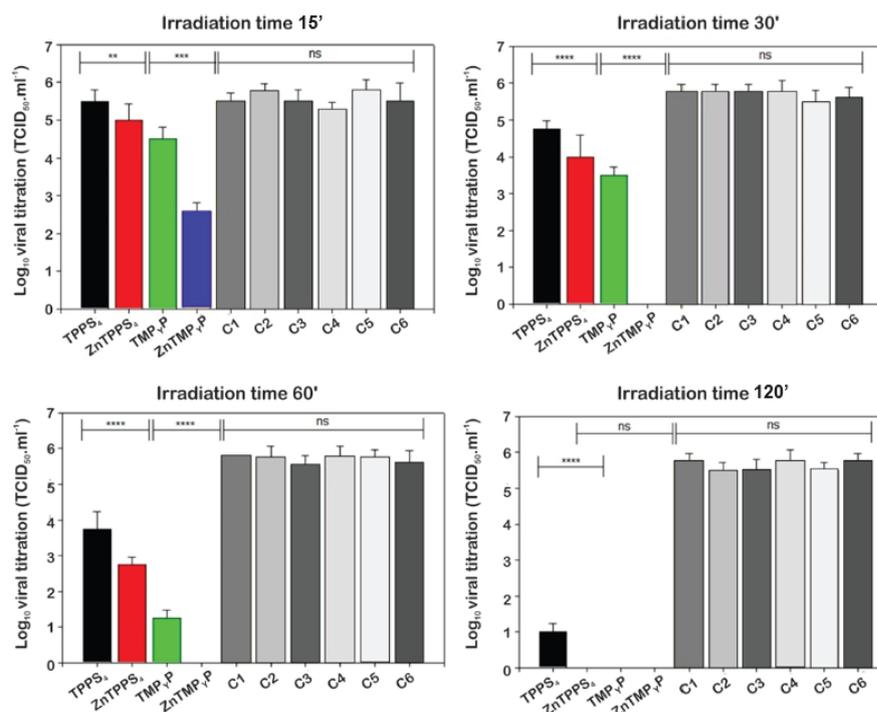
Les composés formés au cours de ces deux types de réactions, ROS et oxygène singlet, peuvent réagir avec les structures biologiques (acides nucléiques, protéines, phospholipides membranaires, etc.), causant ainsi la destruction de ces structures et la mort cellulaire par stress oxydatif. De plus, des études ont démontré qu'en conditions physiologiques l'effet observé était principalement dû aux réactions de type II (Henderson et Dougherty, 1992).

Figure 34 : Diagramme du niveau d'énergie et processus photophysique/photochimique impliqués dans l'inactivation photodynamique (adapté de Dabrowski et Arnaut, 2015 ; Malatesti et al., 2017 ; Teles et al., 2018).



Les résultats de l'étude sur l'inactivation du BoHV-1 sont présentés sur la Figure 35. Ils mettent en évidence une diminution significative de la charge virale dans les échantillons traités par IPD, et celle-ci est d'autant plus importante que la durée d'irradiation était longue. La durée nécessaire pour obtenir une inactivation totale du virus dépendait du type de PS utilisé. Dans cette étude les PS utilisés étaient des porphyrines hydrosolubles : le meso-tetrakis anionique (p-sulfonatofenyl) (TPPS4), meso-tetrakis cationique (methylpyridiniumyl) (TMPyP) et leurs complexes au zinc (ZnTPPS4 and ZnTMPyP).

Figure 35 : Analyse comparative des titres viraux sous IPD en utilisant les porphyrines TPPS4, ZnTPPS4, TMPyP et ZnTMPyP, à des temps d'irradiation de 15, 30, 60 et 120 minutes (Teles et al., 2018).



Légende :

Témoins : C1 : TPPS4 sans lumière ; C2 : ZnTPPS4 sans lumière ; C3 : TMPyP sans lumière ; C4 : ZnTMPyP sans lumière ; C5 : culture virale sans PS et sans lumière ; C6 : culture virale avec lumière.
 ns : absence de différence significative. *, **, ***, **** : différence significative (P<0.05).

Ainsi, la diminution de charge virale la plus importante et la plus rapide est obtenue avec la porphyrine ZnTMPyP. Avec celle-ci la concentration virale était réduite de 3×10^3 après 15 minutes d'irradiation et le virus était complètement inactivé après 30 minutes. De plus, plusieurs études ont démontré l'efficacité et la sécurité des PS dans la thérapie des maladies infectieuses et des néoplasies chez l'animal et chez l'homme en utilisant des formulations topiques et systémiques (Agostinis *et al.*, 2011 ; Buchholz et Walt, 2013 ; Zhang *et al.*, 2015 ; Kleinovink *et al.*, 2016). Ainsi, bien que cette étude ait été réalisée *in vitro*, l'effet de l'inactivation photodynamique a déjà été évalué sur des cellules épithéliales bovines MDBK (cellules de Madin-Darby bovine kidney) afin de déterminer une concentration non cytotoxique et d'assurer l'innocuité de la thérapie *in vivo*. Les auteurs exposent donc que l'utilisation de PS dans les conditions présentées ci-dessus pourrait être précieuse dans des formulations topiques pour le traitement local par irradiation des lésions caractéristiques des troubles de la reproduction (balanoposthite et vulvovaginite) causées par le BoHV-1.

Enfin, cette approche est avantageuse par rapport à celle des médicaments conventionnels car elle élimine virtuellement la possibilité de la sélection de souches virales résistantes pendant le traitement. Elle présente de plus une application prometteuse en

l'utilisant comme un auxiliaire dans le traitement des troubles attribués à l'infection par le BoHV-1.

b. Photo-immuno-inactivation

La photo-immuno-inactivation est une méthode dérivée de l'inactivation photodynamique. Cependant, à la différence de l'IPD, les photosensibilisateurs utilisés sont ici des porphyrines (hématoporphyrine (HP) et zinc tétracarboxy-phtalocyanine (ZnPc)) conjuguées à des immunoglobulines Y (IgY), conduisant ainsi à la formation de photoimmunoconjugués.

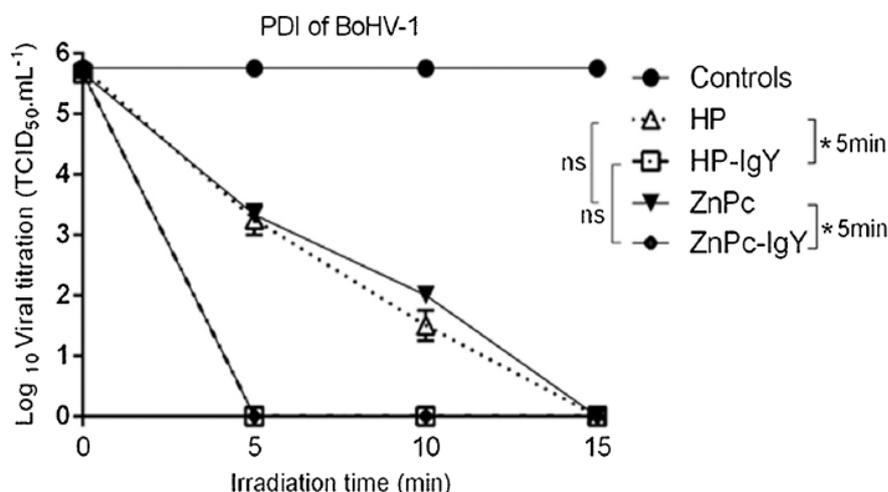
Ainsi, la présence des immunoglobulines permet un contact étroit du PS à l'agent pathogène et ainsi une destruction plus efficace et plus rapide de celui-ci.

De plus, la polyvalence de cette méthode permet l'inclusion d'anticorps spécifiques contre toute une gamme d'autres cibles présentes sur l'agent pathogène (acides nucléiques, protéines affichées sur les capsides ou la surface de l'enveloppe).

Ainsi, Oliveira *et al.* (2020) ont démontré l'efficacité de cette technique pour l'inactivation d'un virus : alphaherpesvirus bovin de type 1 (BoHV-1). Les essais ont été réalisés *in vitro* puis sur de la semence.

Les résultats ont mis en évidence une inactivation complète du virus dans le sperme, et ce avec une durée plus courte que pour la méthode d'IPD. Ainsi, seulement 5 min étaient nécessaires pour une inactivation complète du virus avec la technique de photo-immuno-inactivation, contre 15 minutes pour l'IPD. Les auteurs attribuent la rapidité et l'importance de l'action virucide observée avec les photoimmunoconjugués au contact plus étroit PS-virus induit par les IgY couplées. Les résultats sont présentés sur la figure 36 suivante :

Figure 36 : Titrage viral en fonction du temps d'irradiation des PS sans base (HP et ZnPc), des photoimmunoconjugués (HP-IgY et ZnPc-IgY), et des témoins (Oliveira et al., 2020).



Légende : * : différence significative après 5 min d'irradiation, ns : pas de différence significative.

De plus, la réduction du temps d'irradiation obtenue par l'utilisation de photoimmunoconjugués permet de protéger les molécules non ciblées en minimisant l'exposition des spermatozoïdes à la lumière, ainsi qu'aux ROS. En outre, une durée de vie très courte des ROS (de quelques nanosecondes seulement) (Kothari *et al.*, 2010) limite leur action sur les biomolécules proches, ce qui justifie l'utilisation de photoimmunoconjugués pour une préservation des spermatozoïdes dans la semence. En effet, les résultats de l'étude montrent que les photoimmunoconjugués étaient inoffensifs pour le sperme. Ainsi, pour tous les paramètres de qualité du sperme évalués dans cette étude (motilité, vigueur et mouvement en vague), aucune différence significative n'a été constatée en comparant les échantillons traités avec des photosensibilisateurs à une concentration de 10 μM aux échantillons de sperme témoins non traités, ce qui montre l'absence d'effets indésirables sur le sperme et donc la sécurité de la méthode à cette concentration.

Enfin, les auteurs exposent que la stratégie de photo-immuno-inactivation peut être facilement adaptée à un large éventail d'agents pathogènes présentant un intérêt pour la reproduction, ce qui permettrait de maximiser son utilisation et ainsi de réduire les antibiotiques actuellement utilisés dans les procédés de manipulation de la semence. Toutefois, cette perspective nécessite de rappeler que la technique de photo-immuno-inactivation n'a pour l'instant jamais été testée sur des bactéries, de même que l'association de plusieurs anticorps spécifiques de pathogènes différents simultanément. Enfin, la nécessité d'avoir recours à des anticorps spécifiques des pathogènes à éliminer de la semence restreint le spectre d'action de cette technique.

2. Comparaison des techniques innovantes de traitement de la semence : tableau de synthèse

Afin de pouvoir comparer les techniques entre elles, leurs différentes caractéristiques sont résumées dans le Tableau 20 suivant.

Tableau 20 : Résumé des caractéristiques des différentes techniques innovantes de traitement antimicrobien de la semence.

Technique	Type	Spectre d'action	Efficacité	Tests utilisés pour évaluer la qualité de la semence	Résultats de l'évaluation de la qualité de la semence	Avantages	Inconvénients
Adaptation des méthodes actuelles	Hygiénique	Antibactérien	Réduction de la charge bactérienne dans les échantillons de semence	Aucun	Impact identique aux méthodes actuelles	Simple et peu coûteux donc facilement applicable en pratique	Ne permet qu'une réduction de la contamination bactérienne et ne dispense donc pas de l'utilisation d'antibiotiques. Pas d'effet contre les virus.
Sélection des individus à haute AIDB	Génétique	Antibactérien	Réduction de la charge bactérienne dans les échantillons de semence	Aucun	Non évalué	Réduction de la charge bactérienne contenue initialement dans la semence sans nécessité de traitement	Risque de corrélation négative entre la sélection sur le critère de l'AIDB et d'autres critères de sélection (ex : performances reproductrices lors de la sélection) ? Pas d'effet contre les virus.
CCU	Physique	Antibactérien + Antiviral	Élimination de plus de 99 % des pathogènes de la semence	Nombre de spz, mobilité spermatique et motilité linéaire	Diminution du nombre de spz dans les échantillons mais semence de meilleure qualité par sélection des spz viables	Élimination totale des pathogènes (virus et bactéries). Adaptable pour être utilisable en pratique	Perte de spz
Microfiltration	Physique	Antibactérien	Efficacité non démontrée pour le traitement de la semence	Viabilité des spz, potentiel membranaire et mitochondriale, intégrité de l'acrosome et motilité	Qualité de la semence préservée voire améliorée	Activité antibactérienne sans effet délétère sur la semence	Efficacité non démontrée sur la semence
Huiles essentielles	Chimique	Antibactérien + antiviral potentiel	Réduction jusqu'à 32 % de la charge bactérienne de la semence	Viabilité, motilité, morphologie, intégrité de l'acrosome	Cytotoxicité de certaines huiles, devant être étudiée en amont de leur utilisation	Facilement utilisable en pratique.	Élimination partielle des pathogènes. Difficulté dans le choix de l'HE utilisée car risque de cytotoxicité. Pas d'effet contre les virus.
Bactériocines	Chimique	Antibactérien	Limite la croissance bactérienne dans la semence	Motilité spermatique, intégrité de la membrane plasmique, intégrité de l'acrosome et potentiel de membrane mitochondrial	Amélioration des paramètres de qualité de la semence	Activité antibactérienne sans effet délétère sur la semence, permet une réduction de la quantité d'antibiotiques utilisés. Facilement utilisable en pratique.	Ne permet pas une élimination totale des bactéries. Pas d'effet contre les virus.
Nanoparticules	Chimique	Antibactérien	Inhibition complète de la croissance bactérienne	Aucun	Non évalué	Très bonne efficacité, permettant d'envisager une réduction voire une suppression des traitements antibiotiques.	Impact sur les spz inconnu. Pas d'effet contre les virus.
PAM	Chimique	Antibactérien, <i>a minima</i>	Limite la croissance bactérienne voire réduisent la charge bactérienne	Motilité linéaire, vitesse de déplacement moyenne, dommages membranaires, fécondité <i>in vivo</i> (IA)	Impact positif ou négatif sur la motilité spermatique, peptide et concentration dépendant	Limite la croissance bactérienne, permet une réduction de la quantité d'antibiotiques utilisés. Facilement utilisable en pratique.	Impact négatif sur les spz de certains PAM. Apparition possible de résistances.
Trypsine	Chimique	Antiviral	Élimination complète des virus	Dommages membranaires, motilité fléchante	Dommages membranaires et diminution de la motilité fléchante dès la concentration de 0,30 %	Très bonne efficacité contre les virus. Facilement utilisable en pratique.	Pas d'effet contre les bactéries. Risques de dommages cellulaires aux spz.

Tableau 20 : Résumé des caractéristiques des différentes techniques innovantes de traitement antimicrobien de la semence (continuation).

Technique	Type	Spectre d'action	Efficacité	Tests utilisés pour évaluer la qualité de la semence	Résultats de l'évaluation de la qualité de la semence	Avantages	Inconvénients
Acidification transitoire	Chimique	Antiviral	Efficacité non démontrée pour le traitement de la semence	Motilité, intégrité de l'acrosome, fécondité <i>in vivo</i> (IA)	Sans impact sur la qualité et la fertilité de la semence pour une durée de traitement de 2 min	Efficace contre les virus	Efficacité restreinte à certains types de virus. Efficacité non démontrée dans la semence. Effet contre les bactéries non étudié.
Photo-immuno-inactivation	Immunologique + Physique	Antiviral, élargissement possible	Inactivation complète du virus ciblé	Motilité, vigueur et mouvement en vague des spz	Sans impact sur la qualité de la semence	Très bonne efficacité contre les virus. Spectre pouvant être élargit à un très grand nombre de pathogènes.	Procédure complexe. Nécessite de connaître les pathogènes à cibler.

Pour conclure, de nombreuses méthodes, immunologiques, chimiques ou physiques, sont actuellement étudiées afin de trouver des alternatives aux antibiotiques pour le traitement antimicrobien de la semence. Ces méthodes prometteuses pourraient permettre, grâce à leur efficacité antibactérienne, de réduire voire de supprimer les antibiotiques dans les doses de semence. Ce faisant, cela permettrait d'inclure la semence dans la lutte contre le problème grandissant du développement de résistances bactériennes aux antibiotiques. De plus, certaines techniques comme la photo-immuno-inactivation, l'ajout de trypsine et la centrifugation en couche unique permettent également de traiter la semence des virus qu'elle contient. En complément des normes sanitaires appliquées aux reproducteurs, les traitements antiviraux de la semence permettraient d'accroître la biosécurité des doses de semence utilisées pour l'insémination artificielle. Ces traitements permettraient également de faire reproduire certains mâles contaminés, permettant ainsi la transmission de leur matériel génétique. Cette indication est d'ailleurs l'une des principales pour le recours aux traitements antimicrobiens de la semence chez l'Homme.

Les limites au développement de ces nouveaux traitements résident dans leurs potentiels effets secondaires sur les spermatozoïdes et ainsi la qualité de la semence. Ces effets secondaires devront donc être étudiés et bien connus afin de s'assurer de l'innocuité des traitements avant leur utilisation dans les doses de semence. De plus, peu d'études ont pour l'heure évalué les effets secondaires de ces traitements sur les embryons produits et sur les femelles inséminées mais ceux-ci devront également être considérés avant d'envisager la démocratisation de l'utilisation de ces traitements.

Enfin, le dernier défi à relever pour que ces méthodes innovantes de traitement de la semence puissent être appliquées aux doses d'IA sera de les rendre viables économiquement pour les industriels du secteur. Pour cela, elles ne devront pas être trop chronophages ni trop onéreuses.

Cinquième partie : discussion générale

Face à la diversité des techniques innovantes étudiées pour le traitement antimicrobien de la semence il convient de s'interroger sur leurs possibles utilisations.

Afin de mieux cerner les utilisations potentielles de ces techniques alternatives il faut ainsi tout d'abord distinguer les techniques selon leur spectre d'action, c'est-à-dire selon leur effet antibiotique, antiviral ou global. Ainsi, les techniques d'adaptation des méthodes actuelles, les huiles essentielles, les bactériocines, les nanotubes de carbone à paroi unique PEGylés et nanoparticules d'argent, la sélection des individus avec une haute activité interne de destruction des bactéries et la microfiltration sont des techniques à activité exclusivement antibactérienne. À l'inverse, l'ajout de trypsine dans les doses de semence ou l'acidification transitoire sont des méthodes ciblant spécifiquement les virus. Les techniques de centrifugation par gradient de densité et en couche unique ont quant à elles montré leur efficacité pour la décontamination des bactéries et des virus contenus dans la semence. Enfin, certaines techniques n'ont pour l'heure été testées que sur un nombre limité de pathogènes (bactéries ou virus) mais les résultats obtenus suggèrent que leur spectre d'action pourrait être élargi. C'est notamment le cas de la technique de photo-immuno-inactivation qui a été testée avec succès sur le virus BoHV-1 mais dont les auteurs exposent qu'elle pourrait être facilement adaptée à un large éventail d'agents pathogènes présents dans la semence (Oliveira *et al.*, 2020). De même, l'activité antimicrobienne des peptides antimicrobiens n'a été étudiée que sur les bactéries contenues dans la semence mais des études ont montré qu'ils possédaient un spectre d'action très large envers des microorganismes bactériens mais aussi fongiques, parasitaires et viraux, ce qui suggère que leur rôle antiviral dans le traitement des doses de semence pourrait également être à étudier (Hancock et Sahl, 2006).

Ensuite, certaines techniques possèdent un spectre d'action plus étroit car elles ciblent un ou quelques pathogènes spécifiques. C'est notamment le cas de la technique de photo-immuno-inactivation qui permet l'inactivation uniquement du pathogène dont les anticorps sont utilisés. De plus, même si le spectre d'action de la technique pourrait être élargi à de multiples pathogènes en utilisant les anticorps spécifiques, cette technique nécessite de connaître les pathogènes présents dans la semence et de les avoir caractérisés sérologiquement. De même, l'acidification transitoire n'est efficace que contre les virus pH labiles, ce qui est le cas d'une majorité de familles de virus mais pas de toutes, comme par exemple les Entérovirus ou les Adénovirus (Fenner *et al.*, 1987).

En plus de la question du spectre, la question de l'efficacité des techniques se pose. En effet, alors que certaines techniques permettent une élimination ou une inactivation complète des pathogènes contenus dans la semence, et pourraient ainsi être envisagées comme traitement unique des doses de semence, d'autres ne permettent qu'une réduction de la charge en pathogènes et nécessiteront donc d'être utilisées en association avec d'autres techniques. Ainsi, la technique de photo-immuno-inactivation permet une inactivation complète du virus ciblé (Oliveira *et al.*, 2020), les nanoparticules d'argent

permettent une inhibition complète des bactéries contenues dans la semence (Kim *et al.*, 2007), la CCU permet une élimination de 99 % des bactéries et virus contenus dans la semence (Blomqvist *et al.*, 2011 ; Morrell et Wallgren, 2011b), enfin, l'ajout de trypsine permet une élimination complète des virus de la semence (Bielanski *et al.*, 1988). Les PAM, les huiles essentielles et les bactériocines permettent de limiter la croissance des bactéries contenues dans la semence mais ne permettent pas de les éliminer ou de les inhiber complètement (Speck *et al.*, 2014 ; Ilori *et al.*, 2019 ; Shaoyong *et al.*, 2019 ; Cojkic *et al.*, 2023). Enfin, les techniques de microfiltration et d'acidification transitoires sont supposées comme étant efficaces pour l'élimination des bactéries et des virus respectivement, bien que leur efficacité n'ait pour l'heure pas été démontrée sur la semence.

Une fois le spectre d'action et l'efficacité des techniques cernés, la question se pose pour chacune des techniques de savoir si elle pourrait représenter une alternative complète aux traitements antibiotiques traditionnels, c'est-à-dire remplacer leur utilisation dans les doses de semence, ou si elle représente une technique à utiliser en complément de ceux-ci. Il apparaît alors déjà qu'une simple adaptation des méthodes actuelles ou une sélection des individus avec une haute activité interne de destruction des bactéries permettront certes une réduction de la charge bactérienne dans les doses de semence et une optimisation des traitements antibiotiques utilisés mais ne permettront pas de les supprimer. Ensuite, l'ajout d'huiles essentielles, qui présentent une activité seulement partielle de réduction de la concentration bactérienne dans les doses de semence, et les techniques de traitement par ajout de trypsine et acidification transitoire qui ciblent uniquement les virus, ne permettront pas à elles seules de remplacer les traitements antibiotiques. De même, les auteurs ayant étudié les PAM ne les envisagent pas pour l'heure comme une alternative complète à l'utilisation des antibiotiques traditionnels (Speck *et al.*, 2014). Ensuite, bien que la technique de photo-immuno-inactivation semble très prometteuse pour l'inactivation d'un grand nombre de pathogènes connus de la semence, il paraît difficile de l'envisager comme technique de remplacement total des antibiotiques. En effet, du fait de la très grande variété de bactéries, pathogènes ou commensales, pouvant contaminer la semence, il apparaît difficile et coûteux de disposer d'anticorps spécifiques contre chaque espèce. En particulier, il semble difficilement envisageable d'identifier et cibler toutes les bactéries commensales du tractus génital et urinaire pouvant contaminer la semence lors de l'éjaculation et les bactéries commensales de la flore des manipulateurs de laboratoire. Concernant la microfiltration, les données manquantes sur son efficacité pour le traitement antibactérien de la semence rendent pour l'heure difficilement envisageable son utilisation en remplacement des antibiotiques. Parmi les techniques considérées comme une alternative complète aux traitements antibiotiques traditionnels se trouvent : les bactériocines (Shaoyong *et al.*, 2019), les nanoparticules d'argent (Feugang *et al.*, 2019) et la centrifugation à couche unique (CCU) (Morrell et Wallgren, 2011a).

Enfin, il convient de s'intéresser au contexte potentiel d'utilisation de ces techniques et en particulier de se demander pour chacune si son utilisation devrait être systématique, c'est-à-dire intervenir pour le traitement de la totalité des doses de semence, ou être destinée à certains cas particuliers. Ainsi, plusieurs raisons peuvent être mises en avant

pour l'emploi des techniques innovantes comme alternatives ou compléments aux traitements actuels.

Tout d'abord, comme nous l'avons vu dans la partie III traitant des maladies transmissibles par la semence bovine, les tests de dépistage sérologique de ces maladies n'ont pas une sensibilité parfaite. Ainsi, bien que pour de nombreuses maladies, telles que l'IBR, la FCO ou encore la brucellose, les tests présentent une excellente sensibilité, pour d'autres, telles que la leptospirose, la paratuberculose ou encore la chlamydie la sensibilité des tests est moyenne à faible ; tandis que pour certaines maladies comme la tuberculose, la trichomonose ou encore la campylobactériose, aucun test de dépistage sérologique n'est disponible. Il convient également de noter qu'un résultat faux négatif peut être obtenu en sérologie en raison du délai de latence d'apparition des anticorps. Enfin, seules quelques maladies font l'objet d'un dépistage lors du suivi sanitaire des animaux donneurs de semence et tous les pathogènes potentiellement présents dans la semence ne sont donc pas recherchés. Ainsi, l'utilisation systématique de techniques de traitement antimicrobien à large spectre de la semence serait à privilégier afin de permettre une élimination des pathogènes non détectés lors du suivi sanitaire des animaux donneurs de semence et renforcerait ainsi la sécurité sanitaire des doses de semence vis-à-vis du risque de transmission de maladies par IA (Givens, 2018).

Ensuite, deux stratégies peuvent être envisagées pour l'utilisation des traitements antiviraux des doses de semence. Tout d'abord, une utilisation ciblée pour la semence des mâles reconnus comme infectés. Ainsi, chez l'Homme, l'utilisation de la centrifugation par gradient de densité permet une élimination complète des particules virales du VIH et permet ainsi à des couples de statuts sérologiques discordants, dont l'homme est séropositif pour le VIH, d'avoir recours aux technologies de procréation médicalement assistée sans risquer de transmettre le virus à la mère ou au fœtus (Fourie et al., 2015). Chez l'animal, le traitement antiviral de la semence, en utilisant un traitement à large spectre (CCU, trypsine) ou spécifique du pathogène concerné (photo-immuno-inactivation), permettrait de faire reproduire des mâles avec une excellente valeur génétique mais présentant un résultat positif à une épreuve diagnostique lors du suivi sanitaire. La deuxième stratégie d'utilisation des traitements antiviraux pourrait être une utilisation préventive systématique. En effet, bien qu'actuellement la reproduction de mâles infectés soit interdite et que de nombreux tests de dépistage soient réalisés au cours du suivi sanitaire, des accidents menant à la contamination de doses de semence et à la transmission de maladies sont encore possible. Par exemple, la réintroduction chez les bovins du virus de la Fièvre Catarrhale Ovine sérotype 8 en France entre 2015 et 2018, aurait eu pour origine selon l'hypothèse actuelle une réutilisation de semence contaminée et congelée lors de la 1^{ère} émergence en 2006 (Peroz et Ganière, 2021). Dans ce contexte, des techniques à large spectre antiviral, comme la CCU ou l'ajout de trypsine, pourraient être utilisées afin d'assurer une protection supplémentaire envers la transmission de maladies virales par la semence.

Ainsi, il pourrait être envisagé d'utiliser systématiquement une méthode de traitement antiviral à large spectre de la semence, de façon analogue à l'utilisation systématique des traitements antibiotiques actuellement, afin d'assurer la qualité sanitaire des doses de

semence. Enfin, l'ajout de substances antibiotiques telles que les PAM, les bactériocines ou encore les nanoparticules d'argent pourrait représenter un atout dans la lutte contre l'antibiorésistance en permettant de réduire les doses d'antibiotiques ajoutées à la semence et en limitant le risque de transmission de bactéries qui seraient résistantes aux antibiotiques traditionnellement utilisés dans les doses de semence.

Conclusion

L'utilisation de l'insémination artificielle est actuellement large et toujours croissante, devenant même le mode de reproduction majoritaire dans certaines filières. Ainsi par exemple 59 % de la totalité des élevages bovins ont recours à l'insémination artificielle (Bidan *et al.*, 2018). Toutefois, ce large recours à l'IA amène à veiller scrupuleusement à la qualité sanitaire de la semence utilisée afin de ne pas propager à une large échelle des maladies qu'elle pourrait contenir. En effet, la semence peut contenir les agents pathogènes de nombreuses maladies, bactériennes, virales ou encore parasitaires (Givens, 2018). L'importance de ces maladies peut être économique, par les pertes qu'elles engendrent dans les filières lorsqu'elles sont présentes, mais également pour la santé humaine en raison du caractère zoonotique, et parfois grave, de certaines maladies comme la Tuberculose ou la Brucellose.

Ainsi actuellement des mesures sont mises en œuvre pour éviter la contamination de la semence. Celles-ci reposent en particulier sur des tests de dépistage lors du suivi sanitaire des reproducteurs ainsi que sur des traitements antibiotiques systématiques des doses de semence produites. Toutefois, la sensibilité des tests de dépistage n'est pas toujours parfaite et les traitements appliqués ne permettent pas d'éliminer les virus, des accidents conduisant à la diffusion de maladies par le biais de la semence utilisée pour l'IA sont alors possibles.

Dans le but de permettre un traitement antimicrobien optimal des doses de semence et ainsi d'en garantir la qualité sanitaire, mais aussi de réduire les quantités d'antibiotiques utilisées et de diminuer les risques d'antibiorésistance, des techniques alternatives à ceux-ci ont été étudiées pour le traitement de la semence. Ainsi, il ressort de ces études que la technique de centrifugation en couche unique est la seule technique de traitement antimicrobien de la semence qui pourrait représenter une alternative totale aux traitements antibiotiques, tout en permettant aussi le traitement antiviral des doses de semence. De plus, cette technique présente l'avantage de pouvoir être adaptée afin d'être viable économiquement et ainsi de pouvoir être utilisée en pratique (Morrell, 2019). Ensuite, une technique qui, associée aux antibiotiques, permettrait d'inactiver de manière efficace et ciblée de nombreux pathogènes de la semence, et notamment des virus, est la technique de photo-immuno-inactivation. L'utilisation de PAM, bactériocines, huiles essentielles ou de nanoparticules d'argent dans les doses de semence et la sélection des individus avec une haute activité interne de destruction des bactéries sont des techniques prometteuses pour permettre de réduire les quantités d'antibiotiques utilisées pour le traitement de la semence. Enfin, l'ajout de trypsine ou l'acidification transitoire pourraient être utilisées en complément des antibiotiques pour élargir le traitement des doses de semence aux virus. Enfin, pour chacune de ces techniques, leur impact sur la qualité de la semence a été discuté puisque leur utilisation est conditionnée par leur innocuité envers la semence traitée.

Liste des références bibliographiques

- AARESTRUP, F.M., OLIVER DURAN, C., BURCH, D.G.S. (2008) Antimicrobial resistance in swine production. *Animal Health Research Reviews* vol. 9, n° 2, p. 135-148. [https://doi.org/10.1017/S1466252308001503]
- ACHA, N., SZYFERS, B. (2001) Zoonoses and communicable diseases common to man and animals., 3^e éd. Washington, D.C., Pan American Health Organization.
- AGOSTINIS, P., BERG, K., CENGEL, K., *et al.* (2011) Photodynamic therapy of cancer : an update. *CA: a cancer journal for clinicians* n° 61, p. 250-281.
- AL-MOUSLY, N., CROSS, N.A., ELEY, A., *et al.* (2009) Real-time polymerase chain reaction shows that density centrifugation does not always remove Chlamydia trachomatis from human semen. *Fertility and Sterility* vol. 92, n° 5, p. 1606-1615. [https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.128]
- ALSALEH, A., FIENI, F., MORENO, D., *et al.* (2014) Risk of Coxiella burnetii transmission via embryo transfer using in vitro early bovine embryos. *Theriogenology* vol. 81, n° 6, p. 849-853. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.015]
- ALTHOUSE, G.C., LU, K.G. (2005) Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* vol. 63, n° 2, p. 573-584. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.031]
- ALVAREZ-GARCÍA, G., GARCÍA-CULEBRAS, A., GUTIÉRREZ-EXPÓSITO, D., *et al.* (2013) Serological diagnosis of bovine neosporosis: A comparative study of commercially available ELISA tests. *Veterinary Parasitology* vol. 198, n° 1, p. 85-95. [https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.033]
- ANDREU, D., RIVAS, L. (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* vol. 47, n° 6, p. 415-433. [https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<415::AID-BIP2>3.0.CO;2-D]
- ANNANDALE, C., HOLM, D., EBERSOHN, K., *et al.* (2014) Seminal transmission of lumpy skin disease virus in heifers. *Transboundary and Emerging Diseases* vol. 61, p. 443-448.
- ANNANDALE, C., IRONS, P., BAGLA, V., *et al.* (2010) Sites of persistence of lumpy skin disease virus in the genital tract of experimentally infected bulls. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 45, p. 250-255.
- ANSES (2021) La tuberculose bovine, une maladie surveillée chez les animaux domestiques et sauvages. In *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*. [https://www.anses.fr/fr/content/la-tuberculose-bovine-une-maladie-surveill%C3%A9e-chez-les-animaux-domestiques-et-sauvages] (consulté le 02/10/2022).
- ANSES (2012) Saisine n° « 2010-SA-0280 », Avis de l'Anses relatif à la hiérarchisation de 103 maladies animales présentes dans les filières ruminants, équidés, porcs, volailles et lapins en France métropolitaine. In *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*. [https://www.anses.fr/fr/content/la-tuberculose-bovine-une-maladie-surveill%C3%A9e-chez-les-animaux-domestiques-et-sauvages] (consulté le 03/10/2022).

- AYELE, W.Y., BARTOS, M., SVASTOVA, P., *et al.* (2004) Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology* vol. 103, n° 3-4, p. 209-217. [<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.07.011>]
- AYRAL, F., GAZSO, F., CRESPI, L., *et al.* (2018) *Leptospira*, élevages et écosystèmes : ce que les données de laboratoire nous disent. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* vol. 171, n° 3, p. 167-170. [<https://doi.org/10.4267/2042/70285>]
- AYRAL, F.C., BICOUT, D.J., PEREIRA, H., *et al.* (2014) Distribution of *Leptospira* Serogroups in Cattle Herds and Dogs in France. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 91, n° 4, p. 756-759. [<https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0416>]
- BAKURDZHIEV, K. (1977) Ultrastructural changes in the spermatozoa of sheep infected with *Brucella ovis*. *Veterinarno-Meditsinski Nauki* vol. 14, n° 5, p. 3-12.
- BALI, V., PANESAR, P.S., BERA, M.B., *et al.* (2016) Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* vol. 56, n° 5, p. 817-834. [<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.729231>]
- BARONE, F., VENTRELLA, D., ZANNONI, A., *et al.* (2016) Can Microfiltered Seminal Plasma Preserve the Morphofunctional Characteristics of Porcine Spermatozoa in the Absence of Antibiotics? A Preliminary Study. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 51, n° 4, p. 604-610. [<https://doi.org/10.1111/rda.12699>]
- BAUER, K. (1997) Foot-and-mouth disease as zoonosis. *Archives of Virology Supplementum* n° 13, p. 95-97. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6534-8_9]
- BECHINGER, B., LOHNER, K. (2006) Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica Et Biophysica Acta* vol. 1758, n° 9, p. 13. [<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.07.001>]
- BENANI-NODOT, A., CLAVERT, A., NORTH, M.-L. (1995) Dépistage des marqueurs viraux lors de don de sperme en vue d'assistance médicale à la procréation (AMP). *Revue Française des Laboratoires* vol. 1995, n° 278, p. 33-38. [[https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(95\)80212-6](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(95)80212-6)]
- BENCHIMOL, M., DE ANDRADE ROSA, I., DA SILVA FONTES, R., *et al.* (2008) *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitology Research* vol. 102, n° 4, p. 597-604. [<https://doi.org/10.1007/s00436-007-0793-3>]
- BIDAN, F., SALVETTI, P., LEJARD, A., *et al.* (2018) Stratégies de conduite de la reproduction des bovins 2016-2017. In *Institut de l'Élevage*. [<https://idele.fr/detail-article/strategies-de-conduite-de-la-reproduction-des-bovins-2016-2017>] (consulté le 10/11/2021).
- BIELANSKI, A. (2007) Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology* vol. 68, n° 1, p. 1-22. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.025>]
- BIELANSKI, A., DUBUC, C., HARE, W. (1992) Failure to remove bovine diarrhoea virus (BVDV) from bull semen by swim up and other separatory sperm techniques associated with in vitro fertilization. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 27, n° 5, p. 303-306. [<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1992.tb00837.x>]

- BIELANSKI, A., EASTMAN, P., HARE, W.C.D. (1991) Transitory acidification of semen as a potential method for the inactivation of some pathogenic microorganisms. Effect on fertilization and development of ova in superovulated heifers. *Theriogenology* vol. 36, n° 1, p. 33-40. [[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90431-C](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90431-C)]
- BIELANSKI, A., LOEWEN, K., HARE, W. (1988) Inactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) from in vitro infected bovine semen. *Theriogenology* vol. 30, n° 4, p. 649-657. [[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90431-C](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90431-C)]
- BIELANSKI, A., LOEWEN, K.G., HARE, W.C.D. (1988) Inactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) from in vitro infected bovine semen. *Theriogenology* vol. 30, n° 4, p. 649-657. [[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90300-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90300-7)] Doublon
- BIELZA DIAZ-CANEJA, M., CONTE, C., DITTMANN, C., *et al.* (2009) Risk Management and Agricultural Insurance Schemes in Europe. In *JRC Publications Repository of European Commission*. [<https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC51982>]. (consulté le 02/10/2022).
- BLAZYK, J., WIEGAND, R., KLEIN, J., *et al.* (2001) A novel linear amphipathic beta-sheet cationic antimicrobial peptide with enhanced selectivity for bacterial lipids. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 276, n° 30, p. 27899-27906. [<https://doi.org/10.1074/jbc.M102865200>]
- BLOMQUIST, G., PERSSON, M., WALLGREN, M., *et al.* (2011) Removal of virus from boar semen spiked with porcine circovirus type 2. *Animal Reproduction Science* vol. 126, n° 1-2, p. 108-114. [<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.04.014>]
- BONDURANT, R.H. (2005) Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* vol. 21, n° 2, p. 383-408. [<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2005.03.002>]
- BOREL, N., JANETT, F., TEANKUM, K., *et al.* (2007) Testicular hypoplasia in a bull persistently infected with bovine diarrhoea virus. *Journal of Comparative Pathology* vol. 137, n°2, p. 169-173. [<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.06.002>]
- BRODGEN, K. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews. Microbiology* vol.3, n° 3, p. 238-250. [<https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>]
- BUCHHOLZ, J., WALT, H. (2013) Veterinary photodynamic therapy : a review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* vol. 10, n° 4, p. 342-347. [<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.05.009>]
- BUSSALLEU, E., SANCHO, S., BRIZ, Maria.D., *et al.* (2016) Do antimicrobial peptides PR-39, PMAP-36 and PMAP-37 have any effect on bacterial growth and quality of liquid-stored boar semen ?. *Theriogenology* vol. 89, p. 235-243. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.017>]
- CABANNES, C. (2008) Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine. Thèse de Médecine vétérinaire. Toulouse. École nationale vétérinaire de Toulouse.
- CALDEIRA, J.L.A., FARIA, A.C.S., DIAZ-MIRANDA, E.A., *et al.* (2021) Interaction of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis with bovine sperm. *Theriogenology* vol. 161, p. 228-236. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.007>]
- CAMPAGNOLO, E.R., JOHNSON, K.R., KARPATI, A., *et al.* (2002) Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *The*

Science of the Total Environment vol. 229, n° 1-3, p. 89-95. [[https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(02\)00233-4](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(02)00233-4)]

- CAUCHARD, J., GERBIER, G., LANCELOT, R. (2020) Diffusion de la dermatose nodulaire contagieuse bovine en Eurasie. In *Plateforme ESA*. [<https://www.plateforme-esa.fr/fr/node/763>] (consulté le 26/09/2022).
- CAVALLERI, R., BECKER, J.S., PAVAN, A.M., *et al.* (2018) Essential oils rich in monoterpenes are unsuitable as additives to boar semen extender. *Andrologia* vol. 50, n° 8, p. e13074. [<https://doi.org/10.1111/and.13074>]
- CAVIRANI, S., CABASSI, C.S., DONOFRIO, G., *et al.* (2001) Association between Chlamydia psittaci seropositivity and abortion in Italian dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* vol. 50, n° 1-2, p. 145-151. [[https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(01\)00197-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(01)00197-0)]
- CHASTEL, M. (2008) Épidémiologie de la paratuberculose des ruminants : conséquences sur les mesures de contrôle et de prévention. Thèse de Médecine vétérinaire. Toulouse. École nationale vétérinaire de Toulouse.
- CHIAPPARRONE, M.L., SOTO, P., CATENA, M. (2016) Characterization of the Campylobacter fetus subsp. venerealis Adhesion to Bovine Sperm Cells. *International Journal of Morphology* vol. 34, n° 4, p. 1419-1423. [<https://doi.org/10.4067/S0717-95022016000400040>]
- CHIKHOUNE, A., STOUVENEL, L., IGUER-OUADA, M., *et al.* (2015) In-vitro effects of Thymus munbyanus essential oil and thymol on human sperm motility and function. *Reproductive Biomedicine Online* vol. 31, n° 3, p. 411-420. [<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.011>]
- CHOI, K., MONKE, D., STOTT, J. (2002) Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bulls. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 14, n°5, p. 403-406. [<https://doi.org/10.1177/104063870201400507>]
- COBO, F., CONCHA, A. (2007) Environmental microbial contamination in a stem cell bank. *Letters in Applied Microbiology* vol.44, n° 4, p. 379-386. [<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02095.x>]
- COJKIC, A., HANSSON, I., JOHANNISSON, A., *et al.* (2023) Effect of Some Plant-Based Substances on Microbial Content and Sperm Quality Parameters of Bull Semen. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24, n° 4, p. 3435. [<https://doi.org/10.3390/ijms24043435>]
- COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., MORENO-GONZALO, J., SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R., *et al.* (2019) Prevalence of bovine trichomonosis and associated risk factors in bulls from Spanish beef herds. *Theriogenology* vol. 128, p. 116-121. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.030>]
- COLLEDGE, W.H. (2013) Defending Sperm Function. *PLoS Genetics* vol. 9, n° 10, p. e1003889. [<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003889>]
- COM, E., BOURGEON, F., EVRARD, B., *et al.* (2003) Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice and humans. *Biology of Reproduction* vol. 68 n° 1, p. 95-104. [<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005389>]
- COMMISSION EUROPÉENNE (2018) Règlement d'exécution (UE) 2018/1882 de la Commission du 3 décembre 2018 sur l'application de certaines dispositions en matière de prévention et de lutte contre les maladies à des catégories de maladies répertoriées et établissant une liste des espèces et des groupes d'espèces qui présentent un risque considérable du point de

vue de la propagation de ces maladies répertoriées. In *EUR-Lex* [[https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32018R1882#:~:text=R%C3%A8glement%20d'ex%C3%A9cution%20\(UE\),pr%C3%A9sentent%20un%20risque%20consid%C3%A9rable%20du](https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32018R1882#:~:text=R%C3%A8glement%20d'ex%C3%A9cution%20(UE),pr%C3%A9sentent%20un%20risque%20consid%C3%A9rable%20du)] (consulté le 01/05/2022).

COMMUNAUTÉ ECONOMIQUE EUROPÉENNE (2003) Directive Européenne n°2003-43 du 26 mai 2003 modifiant la directive 88/407/CEE fixant les exigences de police sanitaire applicables aux échanges intracommunautaires et aux importations de sperme d'animaux de l'espèce bovine. In *Légifrance*. [https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000702400?init=true&page=1&query=EXIGENCES+DE+POLICE+SANITAIRE+APPLICABLES+AUX+ECHANGES+INTRACOMMUNAUTAIRES+ET+AUX+IMPORTATIONS+DE+SPERME+D%27ANIMAUX+&searchField=ALL&tab_selection=all] (consulté le 26/09/2022).

COMMUNAUTÉ ECONOMIQUE EUROPÉENNE (1990) Directive Européenne n°90-429 du 26 juin 1990 fixant les exigences de police sanitaire applicables aux échanges intracommunautaires et aux importations de sperme d'animaux de l'espèce porcine. In *Légifrance*. [<https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000705101>] (consulté le 26/09/2022).

COTTRAL, G., GAILIUNAS, P., COX, B. (1968) Foot-and-Mouth Disease Virus in Semen of Bulls and Its Transmission by Artificial Insemination. *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung* vol 23 n° 4, p. 362-377. [<https://doi.org/10.1007/BF01242132>]

COUSSENS, P.M. (2004) Model for Immune Responses to Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis in Cattle. *Infection and Immunity* vol. 72, n° 6, p. 3089-3096. [<https://doi.org/10.1128/IAI.72.6.3089-3096.2004>]

CROSS, N.L. (1998) Role of Cholesterol in Sperm Capacitation1. *Biology of Reproduction* vol. 59, n° 1, p. 7-11. [<https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.7>]

CROZET, G., PRAUD, A., BÉNET, J.-J. (2021) La tuberculose animale. Polycopié. Lyon, Ecoles Nationales Vétérinaires françaises, Unités de maladies contagieuses.

CUTLER, S.J., BOUZID, M., CUTLER, R.R. (2007) Q fever. *Journal of Infection* vol. 54, n° 4, p. 313-318. [<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.10.048>]

DA COSTA, P.M., LOUREIRO, L., MATOS, A.J. (2013) Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* vol. 10, n° 1, p. 278-294. [<https://doi.org/10.3390/ijerph10010278>]

DARVEAU, R.P., CUNNINGHAM, M.D., SEACHORD, C.L., *et al.* (1991) Beta-lactam antibiotics potentiate magainin 2 antimicrobial activity in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* vol. 35, n° 6, p. 1153-1159. [<https://doi.org/10.1128/AAC.35.6.1153>]

DATHE, M., MEYER, J., BEYERMANN, M., *et al.* (2002) General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* vol. 1558, n° 2, p. 171-186. [[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00429-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00429-1)]

DATHE, M., NIKOLENKO, H., KLOSE, J., *et al.* (2004) Cyclization increases the antimicrobial activity and selectivity of arginine- and tryptophan-containing hexapeptides. *Biochemistry* vol.43, n° 28, p. 9140-9150. [<https://doi.org/10.1021/bi035948v>]

- DATHE, M., NIKOLENKO, H., MEYER, J., *et al.* (2001) Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters* vol.501, n° 2-3, p. 146-150. [[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02648-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02648-5)]
- DAVIES, J., SPIEGELMAN, G.B., YIM, G. (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology* vol. 9, n° 5, p. 445-453. [<https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.006>]
- D'CRUZ, O., PEREIRA, H., HAAS, J.G. (1995) Sperm immobilizing activity of a synthetic bioactive peptide 20-44 of 37-kDa cationic antimicrobial protein (CAP37) of human neutrophils. *Journal of Andrology* vol. 16, n° 5, p. 432-440.
- DE CLERCQ, K., DE LEEUW, I., VERHEYDEN, B., *et al.* (2008) Transplacental infection and apparently immunotolerance induced by a wild-type bluetongue virus serotype 8 natural infection. *Transboundary and Emerging Diseases* vol. 55, n° 8, p. 352-359. [<https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2008.01044.x>]
- DE RUIGH, L., BOSCH, J.C., BRUS, M.C., *et al.* (2006) Ways to improve the biosecurity of bovine semen. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 41, n° 4, p. 268-274. [<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00727.x>]
- DE WIT, J., HAGE, J., BRINKHOF, J., *et al.* (1998) A comparative study of serological tests for use in the bovine Herpesvirus 1 eradication programme in The Netherlands. *Veterinary Microbiology* vol. 61, n° 3, p. 153-163. [[https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(98\)00166-7](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00166-7)]
- DIAO, R., FOK, K.L., CHEN, H., *et al.* (2014) Deficient human β -defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection. *Science Translational Medicine* vol. 249, n° 6, p. 1-11. [<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009071>]
- DOMINGO, M., VIDAL, E., MARCO, A. (2014) Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* vol. 97, p. 20-29. [<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.017>]
- DORSCHNER, R.A., LOPEZ-GARCIA, B., PESCHEL, A., *et al.* (2006) The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. *The FASEB Journal* vol. 20, n° 1, p. 35-42. [<https://doi.org/10.1096/fj.05-4406com>]
- DUBEY, J. (2003) Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology* vol. 41, n° 1, p. 1-16. [<https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1>]
- DUMONT, P. (1997) Appréciation de la fonction sexuelle du taureau reproducteur. *Le Point Vétérinaire* vol. 28, p. 19-32.
- EAGLESOME, M.D., GARCIA, M.M. (1997) Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* vol. 16, n° 1, p. 215-225. [<https://doi.org/10.20506/rst.16.1.1017>]
- EBLE, J. (2012) Fiche technique n°11 : La néosporose. In *GDS Puy-de-Dôme*. [<https://www.gds63.com/images/pdf/Fiche-n11-Neosporose.pdf>]. (consulté le 14/10/2022)
- ECKERT, T., GOERICKE-PESCH, S., HEYDEL, C., *et al.* (2019) Interaction of different Chlamydiae species with bovine spermatozoa. *BMC Microbiology* vol. 19, n° 1, p. 23. [<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1392-z>]
- EFSA PANEL ON ANIMAL HEALTH AND WELFARE (AHAW) (2010) Scientific Opinion on Q fever. *EFSA Journal* vol. 8, n° 5, p. 1595. [<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1595>]

- EL-MAHALLAWY, H.S., LU, G., KELLY, P., *et al.* (2015) Q fever in China: a systematic review, 1989–2013. *Epidemiology & Infection* vol. 143, n° 4, p. 673-681. [https://doi.org/10.1017/S0950268814002593]
- ELMI, A., VENTRELLA, D., BARONE, F., *et al.* (2019) In Vitro Effects of Tea Tree Oil (*Melaleuca Alternifolia* Essential Oil) and its Principal Component Terpinen-4-ol on Swine Spermatozoa. *Molecules* vol. 24, n° 6, p.1071. [https://doi.org/10.3390/molecules24061071]
- ELMORE, R. (1985) Evaluating bulls for breeding soundness: concentration and motility of semen. *Veterinary Medicine* vol. 80, p. 80-84.
- EMERY, M.P., OSTLUND, E.N., AIT ICHOU, M., *et al.* (2014) Coxiella burnetii serology assays in goat abortion storm. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 26, n° 1, p. 141-145. [https://doi.org/10.1177/1040638713517233]
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (2011) Risk assessment : New Orthobunyavirus isolated from infected cattle and small livestock – potential implications for human health. In *European Centre for Disease Prevention and Control.eu*. [https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/joint-risk-assessment-new-orthobunyavirus-isolated-infected-cattle-and-small] (consulté le 06/10/2022).
- FENNER, F., BACHMANN, P.A., GIBBS, E.P.J., *et al.* (1987) Structure and Composition of Viruses. *Veterinary Virology* vol. 1, p. 3-19. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-253055-5.50005-0]
- FERRE, I., ADURIZ, G., DEL-POZO, I., *et al.* (2005) Detection of Neospora caninum in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology* vol. 63, n° 5, p. 1504-1518. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.002]
- FERRE, I., SERRANO-MARTÍNEZ, E., MARTÍNEZ, A., *et al.* (2008) Effects of re-infection with Neospora caninum in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. *Theriogenology* vol. 69, n° 7, p. 905-911. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.11.006]
- FEUGANG, J.M., RHOADS, C.E., MUSTAPHA, P.A., *et al.* (2019) Treatment of boar sperm with nanoparticles for improved fertility. *Theriogenology* vol. 137, p. 75-81. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.040]
- FITZGERALD, C. (2015) Campylobacter. *Clinics in Laboratory Medicine, Diagnostic Testing for Enteric Pathogens. Clinics in Laboratory Medicine* vol. 35, n° 2, p. 289-298. [https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.03.001]
- FOURIE, J., LOSKUTOFF, N., HUYSER, C. (2012) Elimination of bacteria from human semen during sperm preparation using density gradient centrifugation with a novel tube insert: Bacteria in human semen and removal thereof. *Andrologia* vol. 44, p. 513-517. [https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01217.x]
- FUTURE MARKET INSIGHTS, Inc. (2021) Animal Artificial Insemination Market: Global Sales Analysis and Opportunity 2031 | FMI. In *Animal Artificial Insemination Market*. [https://www.futuremarketinsights.com/reports/animal-artificial-insemination-market]. (consulté le 11/11/2021).
- GACHE, K., AZÉMA, P., GARIN, E., *et al.* (2018) Répartition géographique et distribution temporelle de la circulation du virus Schmallenberg en France en 2016. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* n° 85.

- GACHE, K., GDS FRANCE (2018) Observatoire et suivi des causes d'avortements chez les ruminants - Bilan 2017. In *Plateforme ESA*. [<https://www.plateforme-esa.fr/fr/observatoire-et-suivi-des-causes-davortements-chez-les-ruminants-oscar>]. (consulté le 06/10/2022)
- GANIÈRE, J.-P., LAABERKI, M.-H. (2021) La Brucellose animale. Polycopié. Maisons-Alfort, Ecoles Nationales Vétérinaires Françaises, Unité des Maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie.
- GDS FRANCE (2021) Virus Schmallenberg: situation épidémiologique. In *GDS France*. [<https://www.gdsfrance.org/virus-schmallenberg-situation-epidemiologique/>] (consulté le 06/10/2022).
- GERARD, O., PONSART, C., PETIT, M., *et al.* (2008) Evolution des techniques de préparation de la semence et d'insémination artificielle chez les bovins. *Le Point Vétérinaire*, vol.51, n° 15, p. 351-354.
- GILBERT, O.R. (2017) Reproductive diseases. In Peek, S.F., Divers, T.J., *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. 3^e éd. Saint Louis, Elsevier, p. 466-508.
- GIVENS, M.D. (2021) Control of Semen-Borne Pathogens. In *Hopper, R. M., Bovine Reproduction*. 2^{ème} éd. Ames, John Wiley & Sons, Ltd, p. 1011-1018. [<https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch80>]
- GIVENS, M.D. (2018) Review : Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal* vol. 12, n°1, p. 165-171. [<https://doi.org/10.1017/S1751731118000708>]
- GRADIL, C., SAMPATH, M., EAGLESOME, M.D. (1994) Detection of verotoxigenic Escherichia coli in bull semen using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* vol. 42, n° 2-3, p. 239-244. [[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90022-1)]
- GUNN, J. (2001) Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *Journal of Endotoxin Research* vol. 7, n° 1, p. 57-62.
- GUPTA, T., PATIAL, V., BALI, D., *et al.* (2020) A review: Lumpy skin disease and its emergence in India. *Veterinary Research Communications* vol. 44, n° 3, p. 111-118. [<https://doi.org/10.1007/s11259-020-09780-1>]
- GWIDA, M., AL DAHOUK, S., MELZER, F., *et al.* (2010) Brucellosis – Regionally Emerging Zoonotic Disease? *Croatian Medical Journal* vol. 51, n° 4, p. 289-295. [<https://doi.org/10.3325/cmj.2010.51.289>]
- HAKIMI, H., GEARY, I., PACEY, A., *et al.* (2006) Spermicidal activity of bacterial lipopolysaccharide is only partly due to lipid A. *Journal of Andrology* vol. 27, n° 6, p. 774-779. [<https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000083>]
- HANCOCK, R.E.W., SAHL, H.-G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* vol. 24, n° 12, p. 1551-1557. [<https://doi.org/10.1038/nbt1267>]
- HENDERSON, B.W., DOUGHERTY, T.J. (1992) How does photodynamic therapy work?. *Photochemistry and Photobiology* vol. 55 n° 1, p. 145-157. [<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x>]

- HERMON-TAYLOR, J., BULL, T.J., SHERIDAN, J.M., *et al.* (2000) Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Canadian Journal of Gastroenterology* vol. 14, n° 6, p. 521-539. [<https://doi.org/10.1155/2000/798305>]
- HERTHNEK, D., ENGLUND, S., WILLEMSEN, P.T.J., *et al.* (2006) Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine semen by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* vol. 100, n° 5, p. 1095-1102. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02924.x>]
- HEUER, H., SMALLA, K. (2007) Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology* vol. 9, n° 3, p. 657-666. [<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x>]
- HILCHIE, A., WUERTH, K., HANCOCK, R. (2013) Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nature Chemical Biology* vol. 9, n° 12, p. 761-768. [<https://doi.org/10.1038/nchembio.1393>]
- HILPERT, K., ELIOTT, M., VOLKMER-ENGERT, R., *et al.* (2006) Sequence requirements and an optimization strategy for short antimicrobial peptides. *Chemistry & Biology* vol. 13, n° 10, p. 1101-1107. [<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.08.014>]
- HOFFMANN, B., SCHULZ, C., BEER, M. (2013) First detection of Schmallenberg virus RNA in bovine semen, Germany, 2012. *Veterinary Microbiology* vol. 167, n° 3-4, p. 289-295. [<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.002>]
- HORIGAN, M.W., BELL, M.M., POLLARD, T.R., *et al.* (2011) Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 23, n° 5, p. 924-931. [<https://doi.org/10.1177/1040638711416971>]
- ILORI, O., SHOKUNBI, O., ALABA, F., *et al.* (2019) Antibacterial activities of aqueous neem bark extract (*Azadirachta indica* A. Juss) on spermatozoa quality in extended porcine semen. *MedCrave Online Journal of Public Health* vol. 8, n°1, p. 16-21. [<https://doi.org/10.15406/mojph.2019.08.00278>]
- INSTITUT DE L'ÉLEVAGE (2008) *Maladie des bovins*, 4^{ème} éd. Paris, France Agricole Editions.
- IRONS, P., TUPPURAINEN, E., VENTER, E. (2005) Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology* vol. 63, n° 5, p. 1290-1297. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.013>]
- JACKSON, R.E., BORMANN, C.L., HASSUN, P.A., *et al.* (2010) Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility* vol. 94, n° 7, p. 2626-2630. [<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.04.049>]
- JAKOP, U., CZIRJÁK, G., HERMANN, C., *et al.* (2019) Species-specific antibacterial defense in boar and bull ejaculates. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 54, n° 5, p. 17-19. [<https://doi.org/10.1111/rda.13386>]
- LEGIFRANCE (2021) Ordonnance n° 2021-1370 du 20 octobre 2021 relative aux mesures de surveillance, de prévention et de lutte contre les maladies animales transmissibles. *In Légifrance*. [<https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000044229368>] (consulté le 03/05/2022).

- JUÁREZ, M.D., TORRES, A., ESPITIA, C. (2001) Characterization of the Mycobacterium tuberculosis region containing the mpt83 and mpt70 genes. *FEMS Microbiology Letters* vol. 203, n° 1, p. 95-102. [<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10826.x>]
- JUNKES, C., WESSOLOWSKI, A., FARNAUD, S., *et al.* (2008) The interaction of arginine- and tryptophan-rich cyclic hexapeptides with Escherichia coli membranes. *Journal of Peptide Science* vol. 14, n° 4, p. 535-543. [<https://doi.org/10.1002/psc.940>]
- KAČÁNIOVÁ, M., TERENTJEVA, M., ŠTEFÁNIKOVÁ, J., *et al.* (2020) Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Selected Essential Oils against Staphylococcus spp. Isolated from Human Semen. *Antibiotics* vol. 9, n° 11, p. 765. [<https://doi.org/10.3390/antibiotics9110765>]
- KAJA, R., OLSON, C. (1982) Non-infectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus. *Theriogenology* vol. 18, n° 1, p. 107-112. [[https://doi.org/10.1016/0093-691x\(82\)90054-1](https://doi.org/10.1016/0093-691x(82)90054-1)]
- KAMDI, R., SAXENA, R., PANIGRAHI, B. (2021) Veterinary Artificial Insemination : market analysis, 2016 – 2028 ; base year 2020. In *GrandViewResearch*. [<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/india-veterinary-artificial-insemination-market>]. (consulté le 12/11/2021)
- KAUFFOLD, J., HENNING, K., BACHMANN, R., *et al.* (2007) The prevalence of chlamydiae of bulls from six bull studs in Germany. *Animal Reproduction Science* vol. 102, n° 1, p. 111-121. [<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.013>]
- KAUFFOLD, J., HOOPS, M., VAHLENKAMP, T.W. (2021) Infectious Agents : Schmallenberg virus. In *Hopper, R. M., Bovine Reproduction*. 2^{ème} éd. Ames, John Wiley & Sons, Ltd, p. 784-792. [<https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch63>]
- KĘSIK-MALISZEWSKA, J., LARSKA, M. (2016) Detection of Schmallenberg Virus RNA in Bull Semen in Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences* vol. 19, n°3, p. 655-657. [<https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0083>]
- KHAMESIPOUR, F., DOOSTI, A., MAZROUEI SEBDANI, M. (2014) Survey for the Presence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the Bull Frozen Semen Samples and Blood Samples of Cattle, Sheep and Camel by Nested-PCR. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* vol. 20, n°5, 681-686. [<https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.10837>]
- KHAYAMABED, R., TAVALAEI, M., TAHERIAN, S., *et al.* (2020) Effect of recombinant β -defensin 1 protein on human sperm motility and viability. *Andrologia* vol. 52, n° 1, p. e13455. [<https://doi.org/10.1111/and.13455>]
- KHOL, J.L., KRALIK, P., SLANA, I., *et al.* (2010) Consecutive Excretion of Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis in Semen of a Breeding Bull Compared to the Distribution in Feces, Tissue and Blood by IS 900 and F57 Quantitative Real-Time PCR and Culture Examinations. *Journal of Veterinary Medical Science* vol. 72, n° 10, p. 1283-1288. [<https://doi.org/10.1292/jyms.10-0052>]
- KHURANA, S.K., SEHRAWAT, A., TIWARI, R., *et al.* (2021) Bovine brucellosis - a comprehensive review. *The Veterinary Quarterly* vol. 41, n° 1, p. 61-88. [<https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1868616>]
- KIM, J.S., KUK, E., YU, K.N., *et al.* (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* vol. 3, n° 1, p. 95-101. [<https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>]

- KIRKLAND, P., RICHARDS, S., ROTHWELL, J., *et al.* (1991) Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *The Veterinary Record*, vol. 128, n° 128, p. 587-590. [https://doi.org/10.1136/vr.128.25.587]
- KLEINOVINK, J., VAN DRIEL, P., SNOEKS, T., *et al.* (2016) Combination of photodynamic therapy and specific immunotherapy efficiently eradicates established tumors. *Clinical Cancer Research* vol. 22, n° 6, p. 1459-1468. [https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0515]
- KOBAYASHI, S., HIRAKURA, Y., MATSUZAKI, K. (2001) Bacteria-selective synergism between the antimicrobial peptides alpha-helical magainin 2 and cyclic beta-sheet tachyplesin I: toward cocktail therapy. *Biochemistry* vol. 40, n° 48, p. 14330-14335. [https://doi.org/10.1021/bi015626w]
- KOTHARI, S., THOMPSON, A., AGARWAL, A., *et al.* (2010) Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 48, n° 5, p. 425-435.
- KRUSZEWSKA, D., TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA, S. (1997) Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Research in Veterinary Science* vol. 62, n° 3, p. 299-300. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288(97)90210-1]
- KRUSZEWSKA, D., TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA, S.K. (1993) *Coxiella burnetii* penetration into the reproductive system of male mice, promoting sexual transmission of infection. *Infection and Immunity* vol. 61, n° 10, p. 4188-4195. [https://doi.org/10.1128/iai.61.10.4188-4195.1993]
- LAURETI, L., MATIC, I., GUTIERREZ, A. (2013) Bacterial responses and genome instability induced by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Antibiotics*, vol.2, n° 1, p. 100-114. [https://doi.org/10.3390/antibiotics2010100]
- LEVY, O. (2000) Antimicrobial proteins and peptides of blood : templates for novel antimicrobial agents. *Blood*, vol. 96, n° 8, p. 2664-2674.
- LILENBAUM, W., MARASSI, C.D., OELEMANN, W.M.R. (2007) Paratuberculosis: an update. *Brazilian Journal of Microbiology* vol. 38, p. 580-590. [https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400001]
- LOSKUTOFF, N.M., HUYSER, C., SINGH, R., *et al.* (2005) Use of a novel washing method combining multiple density gradients and trypsin for removing human immunodeficiency virus-1 and hepatitis C virus from semen. *Fertility and Sterility* vol. 84, n° 4, p. 1001-1010. [https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.03.082]
- LOUREIRO, A.P., LILENBAUM, W. (2020) Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology* vol. 141, p. 41-47. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011]
- MAIOLINO, S.R., CORTEZ, A., LANGONI, H., *et al.* (2021) Sperm viability, serological, molecular, and modified seminal plasma agglutination tests in the diagnosis of *Leptospira* in the semen and serum of bovine bulls. *Brazilian Journal of Microbiology* vol. 52, n° 4, p. 2431-2438. [https://doi.org/10.1007/s42770-021-00562-8]
- MANTUR, B.G., BIRADAR, M.S., BIDRI, R.C., *et al.* (2006) Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years' experience in an endemic

- area. *Journal of Medical Microbiology* vol. 55, n° Pt 7, p. 897-903. [https://doi.org/10.1099/jmm.0.46097-0]
- MARNET, B., VEITIEZ, G., MILHET, P. (2000) Computer-assisted assessment of sperm morphology : comparison with conventional techniques. *International Journal of Andrology* vol. 23, n° 1, p. 22-28. [https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2000.00199.x]
- MARRIE, T.J. (1990) Q fever — a review. *The Canadian Veterinary Journal* vol. 31, n° 8, p. 555-563.
- MCBRIDE, A.J., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G., *et al.* (2005) Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* vol. 18, n° 5, p. 376-386. [https://doi.org/10.1097/01.qco.0000178824.05715.2c]
- MEYLING, A., JENSEN, A.M. (1988) Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Veterinary Microbiology* vol. 17, n° 2, p. 97-105. [https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90001-6]
- MILOVANOVIĆ, M., DIETZE, K., MILIĆEVIĆ, V., *et al.* (2019) Humoral immune response to repeated lumpy skin disease virus vaccination and performance of serological tests. *BMC Veterinary Research* vol. 15, n° 1, p. 80. [https://doi.org/10.1186/s12917-019-1831-y]
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, XICLUNA, P. (2022) La situation de la FCO en France. *In Agriculture.gouv.* [https://agriculture.gouv.fr/la-situation-de-la-fco-en-france] (consulté le 03/05/2022).
- MOCAN, T., MATEA, C.T., POP, T., *et al.* (2017) Carbon nanotubes as anti-bacterial agents. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 74, n° 19, p. 3467-3479. [https://doi.org/10.1007/s00018-017-2532-y]
- MORRELL, J. (2019) Effect of colloid centrifugation on boar sperm quality during storage and function in in vitro fertilization. *Theriogenology* vol. 137, n° 2, p. 122-126. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.046]
- MORRELL, J.M., WALLGREN, M. (2011a) Colloid centrifugation of boar semen. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 46, n°2, p. 18-22. [https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01866.x]
- MORRELL, J.M., WALLGREN, M. (2011b) Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Animal Reproduction Science* vol. 123, n° 1-2, p. 64-69. [https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.11.005]
- MULLER, U., KEMMERLING, K., STRAET, D., *et al.* (2010) Effects of bluetongue virus infection on sperm quality in bulls : a preliminary report. *Veterinary Journal* vol. 186, n° 3, p. 402-403. [https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.09.017]
- MÜNSTER, P., VÖLKEL, I., WEMHEUER, W., *et al.* (2013) A Longitudinal Study to Characterize the Distribution Patterns of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in Semen, Blood and Faeces of a Naturally Infected Bull by IS 900 Semi-Nested and Quantitative Real-Time PCR. *Transboundary and Emerging Diseases* vol. 60, n° 2, p. 175-187. [https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01336.x]
- MURATORI, M., TAROZZI, N., CARPENTIERO, F., *et al.* (2019) Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: effect on DNA fragmentation in viable spermatozoa. *Scientific Reports* vol. 9, n° 1, p. 7492. [https://doi.org/10.1038/s41598-019-43981-2]

- NAZZARO, F., FRATIANNI, F., DE MARTINO, L., *et al.* (2013) Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* vol. 6, n° 12, p. 1451-1474. [<https://doi.org/10.3390/ph6121451>]
- NEWCOMER, B., TOOHEY-KURTH, K., ZHANG, Y., *et al.* (2014) Laboratory diagnosis and transmissibility of bovine viral diarrhoea virus from a bull with a persistent testicular infection. *Veterinary Microbiology* vol. 170, n° 3-4, p. 246-257. [<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.028>]
- NICHOLSON, C., ABRAMSSON, L., HOLM, S., *et al.* (2000) Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. *Human Reproduction* vol. 15, n° 3, p. 662-666. [<https://doi.org/10.1093/humrep/15.3.662>]
- NIELSEN, S.S., TOFT, N. (2009) A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine* vol. 88, n° 1, p. 1-14. [<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.07.003>]
- NIKAIDO, H. (1996) Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* vol. 178, n° 20, p. 5853-5859. [<https://doi.org/10.1128/jb.178.20.5853-5859.1996>]
- NITSCHÉ-MELKUS, E., BORTFELDT, R., JUNG, M., *et al.* (2020) Impact of hygiene on bacterial contamination in extended boar semen: An eight-year retrospective study of 28 European AI centers. *Theriogenology* vol. 146, p. 133-139. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.031>]
- OFFICE FÉDÉRAL SUISSE DE LA SÉCURITÉ ALIMENTAIRE ET, DES AFFAIRES VÉTÉRINAIRES (2021) Néosporose. In *Office fédéral Suisse de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires.ch*. [<https://www.blv.admin.ch/blv/fr/home/tiere/tierseuchen/uebersicht-seuchen/alle-tierseuchen/neosporose.html>]. (consulté le 14/10/2022)
- OKAZAKI, T., MIHARA, T., FUJITA, Y., *et al.* (2010) Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology* vol. 74, n° 9, p. 1691-1700. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.05.019>]
- OLIVEIRA, T.M. dos A., BEZERRA, F.C., GAMBARINI, M.L., *et al.* (2020) Immunoconjugates to increase photoinactivation of bovine alphaherpesvirus 1 in semen. *Veterinary Microbiology* vol. 247, p. Article 108780. [<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108780>]
- ONDRAK, J.D. (2016) Tritrichomonas foetus Prevention and Control in Cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* vol. 32, n° 2, p. 411-423. [<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.010>]
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (2022) Brucellose. In *OMSA - Organisation mondiale de la santé animale*. [<https://www.woah.org/fr/maladie/brucellose/>] (consulté le 29/09/2022).
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (2021a) Chapitre 4.7 - Collecte et traitement de la semence de bovins, de petits ruminants et de verrats. In *Code sanitaire pour les animaux terrestres*. Paris, OIE, p. 165-171. [https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/normes/codes-et-manuels/acces-en-ligne-au-code-terrestre/?id=169&L=1&htmfile=chapitre_coll_semen.htm] (consulté le 06/05/2022).
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (2021b) Code sanitaire pour les animaux terrestres, éd. 2021. Paris, OIE.

- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (2021c) Chapitre 3.1.3 - Fièvre Catarrhale Ovine. *In Manuel terrestre.* Paris, OIE. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.01.03_BLUETONGUE.pdf]. (consulté le 11/10/2022).
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (2021d) Chapitre 3.4.12 - Dermatose Nodulaire Contagieuse Bovine. *In Manuel terrestre.* Paris, OIE. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.04.12_LSD.pdf]. (consulté le 11/10/2022).
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (2021e) Chapitre 3.4.4 - Campylobactériose Génitale Bovine. *In Manuel terrestre.* Paris, OIE. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.04.04_BGC.pdf]. (consulté le 03/10/2022).
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (2021f) Chapitre 3.3.12 - Leptospirose. *In Manuel terrestre.* Paris, OIE. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.01.12_LEPTO.pdf]. (consulté le 07/10/2022).
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (2021g) Chapitre 3.1.16 - Paratuberculose. *In Manuel terrestre.* Paris, OIE. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.01.16_PARATB.pdf]. (consulté le 04/04/2023).
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (2018a) Chapitre 3.4.7 - Diarrhée Virale Bovine. *In Manuel terrestre.* Paris, OIE. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.04.07_BVD.pdf]. (consulté le 11/10/2022).
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (2018b) Chapitre 3.4.9 - Leucose Bovine Enzootique. *In Manuel terrestre.* Paris, OIE. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.04.09_EBL.pdf]. (consulté le 10/10/2022).
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (2018c) Fièvre aphteuse. *In WOA - Organisation Mondiale de la Santé Animale.* [<https://www.oie.int/fr/maladie/fievre-aphteuse/>] (consulté le 05/05/2022).
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE (2018d) Chapitre 3.1.17 - Fièvre Q. *In Manuel terrestre.* Paris, OIE. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.01.17_Q_FEVER.pdf]. (consulté le 05/10/2022).
- OSUAGWUH, U., BAGLA, V., VENTER, E., *et al.* (2007) Absence of lumpy skin disease virus in semen of vaccinated bulls following vaccination and subsequent experimental infection. *Vaccine* vol.25, n° 12, p. 2238-2243. [<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.010>]
- OTTO, M. (2006) Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. *Current Topics in Microbiology and Immunology* vol. 306, n° 6, p. 251-258. [https://doi.org/10.1007/3-540-29916-5_10]
- PAREZ, M., DUPLAN, J. (1987) L'insémination artificielle bovine. Reproduction, amélioration génétique. Paris, ITEB et UNICEIA.

- PASSLER, T., WALZ, P. (2009) Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. *Animal Health Research Reviews* vol. 11, n° 2, p. 191-205. [<https://doi.org/10.1017/S1466252309990065>]
- PAWAR, S.S., TAMILSELVAN, R.P., SARAVANAN, S., *et al.* (2010) Foot and Mouth Disease (FMD) : India and the World. *Science India* vol. 13, n° 4, p. 110-112.
- PAYNE, B., CLARK, S., MADDOX, C., *et al.* (2008) *Achromobacter xylosoxidans* in extended semen causes reproductive failure in artificially inseminated sows and gilts. *Swine Health Production*, vol. 178, n° 16, p. 316-322.
- PEROZ, C., GANIÈRE, J.-P. (2021) Maladies réglementées des ruminants. Polycopié. Maisons-Alfort, Ecoles Nationales Vétérinaires Françaises, Unité des Maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie.
- PERRON, G., ZASLOFF, M., BELL, G. (2006) Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 273, n° 1583, p. 251-258. [<https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3301>]
- PESCHEL, A. (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides ?. *Trends in Microbiology* vol. 10, n° 4, p. 179-186. [[https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)02333-8](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)02333-8)]
- PETIT, T., SPERGSEER, J., AURICH, J., *et al.* (2008) Prevalence of Chlamydiaceae and Mollicutes on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. *Veterinary Microbiology* vol. 127, n° 3, p. 325-333. [<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.022>]
- PETIT, T., SPERGSEER, J., AURICH, J., *et al.* (2008) Examination of semen from bulls at five Austrian artificial insemination centres for chlamydiae and mollicutes. *Veterinary Record* vol. 162, n° 24, p. 792-793. [<https://doi.org/10.1136/vr.162.24.792>]
- PLATEFORME EPIDÉMIOLOGIE SANTÉ ANIMALE (2020) Plateforme ESA - Thématique Fièvre Catarrhale Ovine. *In Plateforme ESA*. [<https://www.plateforme-esa.fr/page/thematique-fievre-catarrhale-ovine>] (consulté le 03/05/2022).
- PRIKAZSKY, M., BVD OBSERVATOIRE (2021) Epidémiologie de la BVD. *In BVD observatoire*. [<https://www.bvdobservatoire.com/BVD-La-maladie/Epidemiologie#:~:text=La%20s%C3%A9ropr%C3%A9valence%20individuelle%20est%20tr%C3%A8s,seraient%20entre%208%20et%2020%20%25.>] (consulté le 03/05/2022).
- PUIG-TIMONET, A., CASTILLO-MARTIN, M., PEREIRA, B.A., *et al.* (2018) Evaluation of porcine beta defensins-1 and -2 as antimicrobial peptides for liquid-stored boar semen: Effects on bacterial growth and sperm quality. *Theriogenology* vol. 178, n° 11, p. 9-18. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.01.014>]
- RAE, D.O., CREWS, J.E. (2006) *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* vol. 22, n° 3, p. 595-611. [<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.07.001>]
- RAMOS, D.F., SILVA, P.E.A., DELLAGOSTIN, O.A. (2015) Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. *Brazilian Journal of Biology* vol. 75, p. 830-837. [<https://doi.org/10.1590/1519-6984.23613>]
- RANJAN, R., SINGH, K.P. (2018) Immunopathology and persistence of Foot-and-Mouth Disease virus following natural infection in cattle and buffaloes in India. *Indian Journal of Veterinary Pathology* vol. 42, n° 1, p. 88-88.

- RATHINAKUMAR, R., WALKENHORST, W., WIMLEY, W. (2009) Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity. *Journal of the American Chemical Society* vol. 131, n° 22, p. 7609-7617. [https://doi.org/10.1021/ja8093247]
- REDDINGTON, J.J., REDDINGTON, G.M., MACLACHLAN, N.J. (1991) A Competitive ELISA for Detection of Antibodies to the Group Antigen of Bluetongue Virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 3, n° 2, p. 144-147. [https://doi.org/10.1177/104063879100300207]
- REICHEL, M.P., PFEIFFER, D.U. (2002) An analysis of the performance characteristics of serological tests for the diagnosis of Neospora caninum infection in cattle. *Veterinary Parasitology* vol. 107, n° 3, p. 197-207. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00086-9]
- RODOLAKIS, A., YOUSEF MOHAMAD, K. (2010) Zoonotic potential of Chlamydophila. *Veterinary Microbiology* vol. 140, n° 3, p. 382-391. [https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.014]
- ROHDE, G., STRAUBE, E., ESSIG, A., et al. (2010) Chlamydial Zoonoses. *Deutsches Arzteblatt International* vol. 107, n° 10, p. 174-180. [https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0174]
- ROUBY, S., ABOULSOUD, E. (2016) Evidence of intrauterine transmission of lumpy skin disease virus. *The Veterinary Journal* vol. 209, p. 193-195. [https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.11.010]
- ROWE, M., CZIRJÁK, G., MCGRAW, K., et al. (2011) Sexual ornamentation reflects antibacterial activity of ejaculates in mallards. *Biology Letters* vol. 7, n° 5, p. 740-742. [https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0276]
- RUIZ, V., PORTA, N.G., LOMÓNACO, M., et al. (2018) Bovine Leukemia Virus Infection in Neonatal Calves. Risk Factors and Control Measures. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 5, n°3, p. 267. [https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00267]
- SAMOJLOVIĆ, M., POLAČEK, V., GURJANOV, V., et al. (2019) Detection of antibodies against Lumpy skin disease virus by Virus neutralization test and ELISA methods. *Acta Veterinaria* vol. 69, n° 1, p. 47-60. [https://doi.org/10.2478/acve-2019-0003]
- SANCHO, S., BRIZ, M., YESTE, M., et al. (2017) Effects of the antimicrobial peptide protegrin 1 on sperm viability and bacterial load of boar seminal doses. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 52 Suppl 4, p. 69-71. [https://doi.org/10.1111/rda.13061]
- SANDVIK, T. (2005) Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Preventive Veterinary Medicine* vol. 72, n° 1, p. 3-16. [https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.015]
- SANTOS, C.S., SILVA, A.R. (2020) Current and alternative trends in antibacterial agents used in mammalian semen technology. *Animal Reproduction* vol. 17, n°2, p. 317-325. [https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0111]
- SCHMIDTCHEN, A., FRICK, I., ANDERSSON, E., et al. (2002) Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Molecular Microbiology* vol. 46, n° 1, p. 157-168. [https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03146.x]
- SCHULZ, C., WERNIKE, K., BEER, M., et al. (2014) Infectious Schmallenberg Virus from Bovine Semen, Germany. *Emerging Infectious Diseases* vol. 20, n° 2, p. 338-340. [https://doi.org/10.3201/eid2002.131436]

- SCHULZE, M, AMMON, C., RÜDIGER, K., *et al.* (2015a) Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology* vol. 83, n° 3, p. 430-437. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.004]
- SCHULZE, M., CZIRJÁK, G., MÜLLER, K., *et al.* (2019) Antibacterial defense and sperm quality in boar ejaculates. *Journal of Reproductive Immunology* vol. 131, n° 1, p. 13-20. [https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.11.001]
- SCHULZE, M., DATHE, M., WABERSKI, D., *et al.* (2016) Liquid storage of boar semen : Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology* vol. 85, n° 1, p. 39-46. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.016]
- SCHULZE, M., GROBBEL, M., MÜLLER, K., *et al.* (2015b) Challenges and Limits Using Antimicrobial Peptides in Boar Semen Preservation. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 50, n° 2, p. 5-10. [https://doi.org/10.1111/rda.12553]
- SCHULZE, M., GROBBEL, M., RIESENBECK, A., *et al.* (2017) Dose rates of antimicrobial substances in boar semen preservation-time to establish new protocols. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 52, n° 3, p. 397-402. [https://doi.org/10.1111/rda.12921]
- SCHULZE, M, GROBBEL, M., RIESENBECK, A., *et al.* (2017) Dose rates of antimicrobial substances in boar semen preservation—time to establish new protocols. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 52, n° 3, p. 397-402. [https://doi.org/10.1111/rda.12921]
- SCHULZE, M., JUNKES, C., MUELLER, P., *et al.* (2014) Effects of Cationic Antimicrobial Peptides on Liquid-Preserved Boar Spermatozoa. *PLoS One* vol. 9, n° 6, p. e100490. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100490]
- SCHULZE, M., NITSCHKE-MELKUS, E., HENSEL, B., *et al.* (2020) Antibiotics and their alternatives in Artificial Breeding in livestock. *Animal Reproduction Science* vol. 220, n°1, p. 106284. [https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106284]
- SCHWARZ, S., CHASLUS-DANCLA, E. (2001) Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research* vol. 32, n° 3-4, p. 201-225. [https://doi.org/10.1051/vetres:2001120]
- SERIKAWA, T., TAKADA, H., KONDO, Y., *et al.* (1984) Multiplication of *Brucella canis* in male reproductive organs and detection of autoantibody to spermatozoa in canine brucellosis. *Developments in Biological Standardization* vol. 56, n° 1, p. 295-305.
- SHAOYONG, W., LI, Q., REN, Z.-Q., *et al.* (2019) Evaluation of ϵ -polylysine as antimicrobial alternative for liquid-stored boar semen. *Theriogenology* vol. 130, n° 2, p. 146-156. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.005]
- SHARIFZADEH, A., FOROOGHI, M. (2021) The survey of frequency Chlamydiae in semen used for artificial insemination. *Journal of Microbial World* vol. 14, n° 4, p. 48-57. [https://doi.org/10.30495/jmw.2021.690447]
- SHIN, S.J., YOO, H.S., MCDONOUGH, S.P., *et al.* (2004) Comparative antibody response of five recombinant antigens in related to bacterial shedding levels and development of serological diagnosis based on 35 kDa antigen for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Veterinary Science* vol. 5, n° 2, p. 111-117. [https://doi.org/10.30495/jmw.2021.690447]

- SILVA, C., SILVA, S., RIBEIRO, S. (2018) Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology* vol. 9, n° 1, p. 594. [https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594]
- SILVA, N., SOLANA, A., CASTRO, J.M. (1999) Evaluation of the effects of different trypsin treatments on semen quality after BHV-1 inactivation, and a comparison of the results before and after freezing, assessed by a computer image analyzer. *Animal Reproduction Science* vol. 54, n° 4, p. 227-235. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320(98)00155-9]
- SPECK, S., COURTIOL, A., JUNKES, C., *et al.* (2014) Cationic Synthetic Peptides: Assessment of Their Antimicrobial Potency in Liquid Preserved Boar Semen. *PLoS One* vol. 9, n° 8, p. e105949. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105949]
- STORZ, J., WHITEMAN, C.E. (1981) Bovine chlamydial abortions. *The Bovine Practitioner* vol. 37, n° 5, p. 71-75. [https://doi.org/10.21423/bovine-vol1981no16p71-75]
- TANGHE, S., VANROOSE, G., VAN SOOM, A., *et al.* (2005) Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. *Reproduction* vol. 130, n° 2, p. 251-259. [https://doi.org/10.1530/rep.1.00636]
- TEANKUM, K., POSPISCHIL, A., JANETT, F., *et al.* (2007) Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks. *Theriogenology* vol. 67, n° 2, p. 303-310. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.012]
- TOUAZI, L., ABERKANE, B., BELLIK, Y., *et al.* (2018) Effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* (L.) on rooster sperm motility during 4°C short-term storage. *Veterinary World* vol. 11, n° 5, p. 590-597. [https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.590-597]
- TUPPURAINEN, E., GALON, N. (2016) Dermatose nodulaire contagieuse : situation actuelle en Europe et dans les régions voisines et mesure de contrôle nécessaires pour stopper sa propagation dans le Sud-Est de l'Europe. In *Plateforme ESA*. [https://plateforme-esa.fr/fr/outils-veille-sanitaire-internationale]. (consulté le 05/05/2022)
- TZVETKOV, D., TZVETKOVA, P. (2006) Tuberculosis of Male Genital System – Myth or Reality in 21st Century. *Archives of Andrology* vol. 52, n° 5, p. 375-381. [https://doi.org/10.1080/01485010600667076]
- VAARA, M., PORRO, M. (1996) Group of peptides that act synergistically with hydrophobic antibiotics against gram-negative enteric bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* vol. 40, n° 8, p. 1801-1805. [https://doi.org/10.1128/AAC.40.8.1801]
- VALAS, S., BRÉMAUD, I., STOURM, S., *et al.* (2019) Improvement of eradication program for infectious bovine rhinotracheitis in France inferred by serological monitoring of singleton reactors in certified BoHV1-free herds. *Preventive Veterinary Medicine* vol. 171, n° 1, p. 104743. [https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104743]
- VAN DER MAATEN, M., MILLER, J. (1978) Susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection by various routes of exposure. In *International Symposium for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases*. Amsterdam, 22-26 juin, p. 29-32.
- VAN DER POEL, W., PARLEVLIT, J.M., VERSTRATEN, E.R. a. M., *et al.* (2014) Schmallenberg virus detection in bovine semen after experimental infection of bulls. *Epidemiology & Infection* vol. 142, n° 7, p. 1495-1500. [https://doi.org/10.1017/S0950268813002574]

- VAN DER POEL, W.H.M., CAY, B., ZIENTARA, S., *et al.* (2014) Limited interlaboratory comparison of Schmallenberg virus antibody detection in serum samples. *The Veterinary Record* vol. 174, n° 15, p. 380. [<https://doi.org/10.1136/vr.102180>]
- VANBINST, T., VANDENBUSSCHE, F., DERNELLE, E., *et al.* (2010) A duplex real-time RT-PCR for the detection of bluetongue virus in bovine semen. *Journal of Virological Methods* vol. 169, n° 1, p. 162-168. [<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.019>]
- VAN OIRSCHOT, J. (1995) Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *The Veterinary Quarterly* vol. 17, n° 1, p. 29-33. [<https://doi.org/10.1080/01652176.1995.9694526>]
- VINCENT, P., UNDERWOOD, S.L., DOLBEC, C., *et al.* (2014) Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers. In Hopper, R. M., *Bovine Reproduction*. Ames, John Wiley & Sons, Ltd, p. 685-695. [<https://doi.org/10.1002/9781118833971.ch74>]
- VLAHOVIĆ, K., DOVČ, A., ŽUPANČIĆ, Ž., *et al.* (2001) Comparison of serological procedures for diagnosis of infection with Chlamydia sp. in bovines. *Veterinarski Arhiv* vol. 71, n° 6, p. 367-379.
- VOGEL, F., FLORES, E., WEIBLEN, R., *et al.* (2004) Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. *Veterinary Microbiology* vol. 98, n° 3-4, p. 185-196. [<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.09.020>]
- WALLMANN, J., SCHRÖTER, K., WIELER, L.H., *et al.* (2003) National antibiotic resistance monitoring in veterinary pathogens from sick food-producing animals: the German programme and results from the 2001 pilot study. *International Journal of Antimicrobial Agents* vol. 22, n° 4, p. 420-428. [[https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(03\)00151-1](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(03)00151-1)]
- WEIBLEN, R., KREUTZ, L., CANABARRO, T., *et al.* (1992) Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 4, n° 3, p. 341-343. [<https://doi.org/10.1177/104063879200400321>]
- WESOŁOWSKI, A., BIENERT, M., DATHE, M. (2004) Antimicrobial activity of arginine- and tryptophan-rich hexapeptides: the effects of aromatic clusters, D-amino acid substitution and cyclization. *The Journal of Peptide Research* vol. 64, n° 4, p. 159-169. [<https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2004.00182.x>]
- WILMES, M., CAMMUE, B., SAHL, H., *et al.* (2011) Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. *Natural Product Reports* vol. 28, n° 8, p. 1350-1358. [<https://doi.org/10.1039/c1np00022e>]
- WRATHALL, A., SIMMONS, H., VAN SOOM, A. (2006) Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. *Theriogenology* vol. 65, n° 2, p. 247-274. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.043>]
- YENUGU, S., CHINTALGATTU, V., WINGARD, C., *et al.* (2006) Identification, cloning and functional characterization of novel beta-defensins in the rat (*Rattus norvegicus*). *Reproductive Biology and Endocrinology* vol. 4, n° 1, p. 7. [<https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-7>]
- YENUGU, S., HAMIL, K., RADHAKRISHNAN, Y., *et al.* (2004) The androgen-regulated epididymal sperm-binding protein, human beta-defensin 118 (DEFB118) (formerly ESC42), is an

- antimicrobial beta-defensin. *Endocrinology* vol. 145, n° 7, p. 3165-3173. [https://doi.org/10.1210/en.2003-1698]
- ZANICH, A., PASCALL, J., JONES, R. (2003) Secreted epididymal glycoprotein 2D6 that binds to the sperm's plasma membrane is a member of the beta-defensin superfamily of pore-forming glycopeptides. *Biology of Reproduction* vol. 69, n° 6, p. 1831-1842. [https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018606]
- ZHANG, Y., DAI, T., WANG, M., *et al.* (2015) Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation mediated by a cationic fullerene by added iodide: in vitro and in vivo studies. *Nanomedicine* vol. 10, n° 4, p. 603-614. [https://doi.org/10.2217/nnm.14.131]
- ZHOU, C., ZHANG, Y., XIAO, L., *et al.* (2004) An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nature Cell Biology* vol. 6, n° 5, p. 458-464. [https://doi.org/10.1038/ncb1127]
- ZHOU, Y.S., WEBB, S., LETTICE, L., *et al.* (2013) Partial Deletion of Chromosome 8 β -defensin Cluster Confers Sperm Dysfunction and Infertility in Male Mice. *PLoS Genetics* vol. 9, n° 10, p. e1003826. [https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003826]
- ZINI, A., FINELLI, A., PHANG, D., *et al.* (2000) Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology* vol. 56, n° 6, p. 1081-1084. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295(00)00770-6]
- ZUPIN, L., POLESELLO, V., MARTINELLI, M., *et al.* (2019) Human β -defensin 1 in follicular fluid and semen: Impact on fertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* vol. 78, n° 36, p. 787-797. [https://doi.org/10.1007/s10815-019-01409-w]

ÉTAT DES LIEUX DES TECHNOLOGIES INNOVANTES POUR LE TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE ET ANTIVIRAL DE LA SEMENCE

AUTEUR : Lucile GUÉDON

RÉSUMÉ :

Le recours large et toujours grandissant à l'insémination artificielle appelle à veiller à la qualité sanitaire des doses de semence utilisées afin de ne pas diffuser à grande échelle des maladies qu'elles pourraient contenir. Pour ce faire, des tests de dépistage sont appliqués aux reproducteurs au cours du suivi sanitaire et des traitements antibiotiques sont ajoutés aux doses de semence produites. Toutefois, ces mesures ne sont pas toujours suffisantes pour éviter la transmission de pathogènes via l'IA, en particulier vis-à-vis des virus. De plus, le recours massif à des antibiotiques à large spectre amène la problématique de l'antibiorésistance.

Ainsi, l'objectif de ce travail bibliographique sera dans un premier temps de faire un rappel des mesures de suivi sanitaire des reproducteurs et des méthodes de traitement de la semence ainsi que de décrire les agents pathogènes transmissibles par la semence avant de faire un état des lieux des méthodes innovantes de traitement de la semence qui représentent ainsi une alternative aux méthodes de traitement existantes, en particulier à l'usage d'antibiotiques, mais qui permettent également d'élargir le spectre de traitement de la semence à d'autres groupes de pathogènes, et notamment aux virus. Nous en comparerons ensuite les caractéristiques telles que le spectre d'action, l'efficacité et l'impact sur la qualité de la semence.

Les études montrent qu'actuellement la technique de centrifugation en couche unique est la seule technique de traitement antimicrobien de la semence qui pourrait représenter une alternative totale aux traitements antibiotiques, tout en permettant aussi le traitement antiviral des doses de semence. De plus, cette technique présente l'avantage de pouvoir être adaptée afin d'être viable économiquement et ainsi de pouvoir être utilisée en pratique. Ensuite, une technique qui, associée aux antibiotiques, permettrait d'inactiver de manière efficace et ciblée de nombreux pathogènes contenus dans la semence, et notamment des virus, est la technique de photo-immuno-inactivation. L'utilisation de PAM, bactériocines, huiles essentielles ou de nanoparticules d'argent dans les doses de semence et la sélection des individus avec une haute activité interne de destruction des bactéries sont des techniques prometteuses pour permettre de réduire les quantités d'antibiotiques utilisées pour le traitement de la semence. Enfin, l'ajout de trypsine ou l'acidification transitoire pourraient être utilisées en complément des antibiotiques pour élargir le traitement des doses de semence aux virus. Enfin, pour chacune de ces techniques, nous discuterons leur impact sur la qualité de la semence puisque leur utilisation est conditionnée par leur innocuité envers la semence traitée.

MOTS CLÉS :

ALTERNATIF, ANTIBIOTIQUE, ANTI-INFECTIEUX, ANTIVIRAL, INNOVATION, SEMENCE, TRAITEMENT

JURY :

Présidente : Pr Sophie LE PODER

Directrice de thèse : Dr Alline DE PAULA REIS

Examinatrice : Dr Anne-Claire LAGRÉE

STATE OF THE ART IN INNOVATIVE TECHNOLOGIES FOR THE ANTIBIOTIC AND ANTIVIRAL TREATMENT OF SEMEN

AUTHOR: Lucile GUÉDON

SUMMARY:

The widespread and ever-increasing use of artificial insemination imposes a strict control of the microbiological quality of the semen used, in order to avoid spreading reproductive diseases. To achieve this, screening tests are applied to males to avoid the use of contaminated males and antibiotic treatments are added to the doses of semen produced. However, these measures are not entirely free of risk, particularly when it comes to viruses. In addition, the massive use of broad-spectrum antibiotics raises the issue of antibiotic resistance.

The aim of this literature review will therefore be to review the health monitoring of breeding stock and semen treatment methods, and to describe the pathogens that can be transmitted via semen, before taking stock of innovative semen treatment methods that represent an alternative to existing treatment methods, in particular the use of antibiotics, but which also make it possible to extend the spectrum of semen treatment to other groups of pathogens, in particular viruses. We will then compare their characteristics, such as spectrum of action, efficacy and impact on seed quality.

Studies show that the single-layer centrifugation technique is currently the only antimicrobial semen treatment technique that could represent a total alternative to antibiotic treatments, while also allowing antiviral treatment of semen doses. In addition, this technique has the advantage of being adaptable so that it is economically viable and can therefore be used in practice. Secondly, a technique which, combined with antibiotics, would enable numerous pathogens contained in semen, and in particular viruses, to be inactivated in an effective and targeted manner, is the photo-immuno-inactivation technique. The use of PAMs, bacteriocins, essential oils or silver nanoparticles in doses of semen and the selection of individuals with a high internal bacterial killing activity are promising techniques for reducing the quantities of antibiotics used to treat semen. Finally, the addition of trypsin or transient acidification could be used alongside antibiotics to extend the treatment of semen doses to viruses. Finally, for each of these techniques, we will discuss their impact on the quality of the semen, since their use is conditional on their harmlessness to the treated semen.

KEYWORDS:

ALTERNATIVE, ANTIBIOTICS, ANTIMICROBIAL, ANTIVIRAL, INNOVATION, SEED, TREATMENT

JURY:

Chairperson: Pr Sophie LE PODER

Thesis Director: Dr Alline DE PAULA REIS

Reviewer: Dr Anne-Claire LAGRÉE