



HAL
open science

Évaluation de nouveaux pièges à mouches hématophages, et de leur utilité dans l'étude et le contrôle des stomoxes et de la besnoitiose bovine

Leïla Graba

► **To cite this version:**

Leïla Graba. Évaluation de nouveaux pièges à mouches hématophages, et de leur utilité dans l'étude et le contrôle des stomoxes et de la besnoitiose bovine. Médecine vétérinaire et santé animale. 2024. dumas-04811387

HAL Id: dumas-04811387

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04811387v1>

Submitted on 29 Nov 2024

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

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

ANNEE 2024 THESE : 2024 – TOU 3 – 4105

ÉVALUATION DE NOUVEAUX PIÈGES À MOUCHES HÉMATOPHAGES, ET DE LEUR UTILITÉ DANS L'ÉTUDE ET LE CONTRÔLE DES STOMOXES ET DE LA BESNOITIOSE BOVINE

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

GRABA Leïla, Chantal, Léni

Directeur de thèse : M. Marc DESQUESNES

JURY

PRESIDENT :

M. Philippe JACQUIET

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Marc DESQUESNES

M. Laurent-Xavier NOUVEL

Chargé de recherche au CIRAD

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Membres invitées :

Mme Nathalie VERDEILLE

Mme Christelle GRISEZ

Technicienne au sein du GDS du Tarn

Ingénieure de recherche à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

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

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie-Thérapeutique*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **COMBARROS Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- M. **FERCHIOU Ahmed**, *Economie et gestion des entreprises vétérinaires agricoles*
- M. **FUSADE-BOYER**, *Microbiologie et infectiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE GRAVERAND Quentin**, *Alimentation animale*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **OTAVIANO DO REGO Renato**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PIERRON Alix**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
- Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique vétérinaire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Felipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
- Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

Remerciements

À Monsieur Philippe Jacquet

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, *Parasitologie et Maladies parasitaires*

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

Hommages respectueux.

À Monsieur Laurent-Xavier Nouvel

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, *Pathologie de la reproduction*

Pour avoir accepté le rôle d'assesseur.

Remerciements chaleureux.

À Monsieur Marc Desquesnes

Chercheur au sein de l'UMR Intertryp (CIRAD-IRD). En poste au service de parasitologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Pour avoir accepté la direction de cette thèse et accompagnée durant cette année.

Sincères remerciements.

À Madame Christelle Grisez

Ingénieure de recherche à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, *Parasitologie et Maladies parasitaires*

Pour m'avoir encadrée lors des expériences de laboratoire et pour votre disponibilité.

Sincères remerciements.

À Madame Nathalie Verdeille, Madame Fany Trotier et Monsieur Christophe

Lacz

Respectivement, Technicienne au sein du GDS du Tarn, Vétérinaire au sein du GDS d'Aveyron et Responsable du FRGDS Occitanie

Pour avoir permis la réalisation des expériences de terrain et le recrutement des éleveurs ainsi que pour l'aide apportée.

Sincères remerciements.

À Monsieur Théotime Guiffroy et à Madame Mariana Ribeiro Sato

En stage au service de parasitologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pour m'avoir aidée lors de vos périodes de stages respectives à collecter et analyser ces données.

Sincères remerciements

Tables des matières

TABLE DES FIGURES.....	8
TABLE DES TABLEAUX	11
TABLE DES ANNEXES	11
TABLE DES ABREVIATIONS	12
CONTEXTE GENERAL DE LA THESE	13
PREMIERE PARTIE : ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LA BESNOITIOSE	14
1. LA BESNOITIOSE BOVINE : ASPECTS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES	14
1.1. <i>Signes cliniques de la besnoitiose</i>	14
1.2. <i>Épidémiologie de la besnoitiose</i>	16
2. LUTTE CONTRE LA BESNOITIOSE PAR DEPISTAGE ET ISOLEMENT/ELIMINATION DES ANIMAUX INFECTES	17
2.1. <i>Méthodes de dépistage</i>	17
2.2. <i>Stratégies d'isolement et d'élimination</i>	19
3. LUTTE PAR NEUTRALISATION DES VECTEURS DE LA MALADIE.....	21
3.1. <i>Importance des mouches hématophages : illustration par le cas de Stomoxys calcitrans</i>	21
3.2. <i>Lutte par piégeage</i>	24
3.3. <i>Lutte par procédés chimiques</i>	26
3.4. <i>Lutte par action sur l'environnement</i>	29
3.5. <i>Lutte par procédés biologiques</i>	30
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	31
DEUXIEME PARTIE : ÉVALUATION DE NOUVEAUX PIEGES A MOUCHES HEMATOPHAGES PAR LA METHODE DES CARRÉS LATINS.....	37
1. OBJECTIFS ET CONTEXTE DE L'ÉTUDE.....	37
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	37
2.1. <i>Présentation des nouveaux pièges</i>	37
2.1. <i>Conditions expérimentales</i>	39
2.3. <i>Analyses statistiques</i>	40
3. RESULTATS	41
3.1. <i>Sensibilité des pièges évalués</i>	41
3.2. <i>Spécificité des pièges évalués</i>	42
4. DISCUSSION	43
4. CONCLUSION.....	44
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	44
TROISIEME PARTIE : SURVEILLANCE DE LA POPULATION DE STOMOXES DANS 5 ELEVAGES DU GERS.....	45
1. OBJECTIF ET CONTEXTE DE L'ÉTUDE	45

2. MATERIELS ET METHODES	47
2.1. Description des pièges utilisés	47
2.2. Collecte des données	48
2.3. Présentation des élevages	48
2.4. Déploiement des pièges dans les cinq élevages	49
3. RESULTATS	50
3.1. Étude phénologique des stomoxes sur cinq élevages du Gers	50
3.2. Impact de la mise en place des pièges de « lutte » sur la présence de stomoxes	53
3. DISCUSSION	54
4. CONCLUSION	57
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	57
QUATRIEME PARTIE : ÉTUDE DE LA PROPAGATION DU PATHOGENE <i>BESNOITIA BESNOITI</i> PAR LES STOMOXES A L'AIDE DE LIGNES DE PIEGES A MOUCHES HEMATOPHAGES	59
INTRODUCTION	59
1. MATERIELS ET METHODES	62
1.1. Déploiement des pièges et capture des insectes dans deux élevages infectés	62
1.2. Détection de l'ADN de <i>Besnoitia besnoiti</i> par PCR en temps réel	69
2. RESULTATS	72
2.1. Diffusion dans l'espace des stomoxes en présence de pièges à mouches hématophages	72
2.2. Propagation dans l'espace du pathogène <i>B. besnoiti</i>	73
3. DISCUSSION	76
4. CONCLUSION	79
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	80
CONCLUSION GENERALE	84
ANNEXES	87

Table des figures

Figure 1 : Examens histopathologiques d'une biopsie cutanée (barre d'échelle 50 µm) chez un bovin atteint de besnoitiose.	15
Figure 2 : Signes cliniques détectés en phase chronique de la besnoitiose.	15
Figure 3 : Répartition mondiale des infections à <i>Besnoitia spp</i> chez les ongulés (Álvarez-García et al. 2013).	16
Figure 4 : Les possibilités de diagnostic expérimental de la besnoitiose (Alzieu et al. 2017).	18
Figure 5 : (A) : Ponction à l'aide d'un Biopsy Punch ® à la base de la queue ; (B) : Prélèvement de peau réalisé avec un Biopsy Punch ® de 6-8 mm (Bottari 2019)....	19
Figure 6 : Priorisation de l'élimination en fonction des différents profils de bovins présents dans un cheptel infecté (dérivé de Bottari 2019)	20
Figure 7 : Aspect général de <i>Stomoxys calcitrans</i> en vue dorsale à gauche et latérale à droite (photographies originales). La tête de flèche désigne l'appareil piqueur des stomoxes.....	22
Figure 8 : Vues latérales de la tête et des pièces buccales de <i>Stomoxys sp.</i> (Duvallat 2023).....	22
Figure 9 : Piège Vavoua (Bouyer et al. 2005)	25
Figure 10 : Piège Nzi (Bouyer et al. 2005)	25
Figure 11 : Photographies et schémas des pièges P23d+ (A), P33 (B) et P35 (C) .	38
Figure 12 : Photographie d'un dispositif de capture et conservation des insectes ...	39
Figure 13 : Présentation de la répartition des sites d'expérience du carré latin au sein du Centre Équestre de l'ENVT (capture d'écran Google Maps 06/04/2024).....	39
Figure 14 : Comparaison de la sensibilité des pièges évalués : boîtes à moustache représentant la distribution des effectifs de stomoxes capturés par jour pour les pièges P23d+, P33, P35 et « Vavoua », et leur signification statistique.	41
Figure 15 : Comparaison de la spécificité des pièges évalués : boîtes à moustache représentant la proportion de stomoxes capturés par jour pour les pièges P23d+, P33, P35 et « Vavoua », et leur signification statistique.....	43

Figure 16 : Dynamique de population de <i>Stomoxys calcitrans</i> et courbes de températures en (maximales, minimales et moyennes) au cours de l'année 2009 et d'après (Rouet 2011) sur le site de l'ENVT.....	45
Figure 17 : Cartographie des 5 élevages étudiés dans le Gers	46
Figure 18 : Prototypes de pièges expérimentaux : (A) Prototype de piège « P2 » (photographie de L. Miquel) (B) Prototype de piège « P4 », (C) Prototype de piège « P10 » (D) Prototype de piège « P23 »	47
Figure 19 : Frise chronologique indiquant la présence de pièges dans les différents élevages. En rouge sont représentés les pièges « Vavoua » et en bleu les pièges expérimentaux.	49
Figure 20 : Dispositions des pièges dans les cinq élevages (A) Aubiet (B) Marsan (C) Castelnau d'Arbieu (D) Homps (E) Escorneboeuf	50
Figure 21 : Densité apparente moyenne de stomoxe par piège « Vavoua » et par jour entre le 25/06/2021 et le 10/09/2024 dans les élevages d'Aubiet (A) et de Marsan (B).	51
Figure 22 : Densité apparente moyenne de stomoxe par piège « Vavoua » et par jour entre le 19/05/2021 et le 10/09/2024 dans les élevages de Castelnau d'Arbieu (A), de Homps (B) et d'Escorneboeuf (C).....	52
Figure 23 : Variations des températures et de la pluviométrie au cours des années 2021 à 2024 associées aux dynamiques de population de stomoxes observées dans les élevages de Aubiet (A) et Marsan (B).....	56
Figure 24 : Représentation schématique de l'expérimentation	63
Figure 25 : Plan de l'installation de l'expérience sur le site de l'élevage A	65
Figure 26 : (A) Photographie d'un piège P10 avec dispositif de conservation (B) Photographie de l'expérimentation sur le site de l'élevage A avec visualisation de piège Vavoua et P10.	66
Figure 28 : Installation sur le site de l'élevage B avec visualisation les lignes 1, 2 et 3 et de piège Vavoua et P10.....	68
Figure 27 : Plan de l'installation sur le site de l'élevage B	68

Figure 29 : Photographies du piège Vavoua en position V4 avec l'élevage voisin en arrière-plan (A), d'un piège P23 avec l'élevage B en arrière-plan (B), du piège Vavoua V0,4 dans la stabulation (C).....	69
Figure 30 : (A) Abdomens de stomoxes disposés sur une boîte de pétri ; (B) Échantillon hydrolysé suite à l'étape de « Lyse 2 ».....	70
Figure 31 : (A) Mise en place de la plaque de PCR dans le thermocycleur Stratagène Mx3005P ; (B) Programmation d'une série de PCR en temps réel sur le logiciel MxPro avec, sur la 4 ^e colonne de haut en bas, le témoin négatif, le témoin positif et le mix.	72
Figure 32 : Histogramme des densités apparentes moyennes en fonction de la position et du type de piège.	73
Figure 34 : Histogramme empilé des résultats de la PCR sur extraits de stomoxes pour la recherche d'ADN de <i>B. besnoiti</i> dans l'élevage A avec répartition des résultats positifs et négatifs pour chaque ligne de piège.	74
Figure 33 : Histogramme empilé des résultats de la PCR sur extraits de stomoxes pour la recherche d'ADN de bovin dans l'élevage A avec répartition des résultats positifs et négatifs pour chaque ligne de piège.	74
Figure 35 : Histogramme empilé des résultats de la PCR sur extraits de stomoxes pour la recherche d'ADN de bovin dans l'élevage B avec répartition des résultats positifs et négatifs pour chaque ligne de piège.	75
Figure 36 : Histogramme empilé des résultats de la PCR sur extraits de stomoxes pour la recherche d'ADN de <i>B. besnoiti</i> dans l'élevage B avec répartition des résultats positifs et négatifs pour chaque ligne de piège.	76
Figure 37 : Rayon d'action des tabanidés et stomoxes lors de la compétition du repas de sang chez les bovins (Alzieu, Jacquet 2016).	77

Table des tableaux

Tableau 1 : Représentation d'un cycle entier, ou réplication, d'un carré latin d'ordre 4	40
Tableau 2 : Présentation des caractéristiques générales des 5 élevages sites de l'étude	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 3 : Caractéristiques générales et historique de la besnoitiose des élevages A et B.	64
Tableau 4 : Protocole d'extraction à l'aide du kit « QIAamp ^R DNA Mini Kit ». Les « buffers » ATL, AL, AW1, AW2 et AE sont issus du kit.....	71

Table des annexes

Annexe 1 : Résultats des PCR quantitative sur peaux positives dans les élevages A et B	87
Annexe 2 : Description des lots et données des PCR en temps réel de l'élevage A87	
Annexe 3 : Protocole d'amplification du kit ADIAVET TM BESNOITIA REAL TIME ...	89
Annexe 4 : Résultats des moyennes de densité apparente par piège (DAP) dans l'élevage B	89
Annexe 5 : Description des lots et données des PCR en temps réel de l'élevage B90	

Table des abréviations

°C : Degré Celsius

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

cm : Centimètre

Ct : Cycle threshold

DAP : Densité apparente par piège

DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane

DPT : Département

EFSA : European Food Safety Authority

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FAM : carboxyfluorescéine

ENVT : École Nationale Vétérinaire de Toulouse

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

h : Heure

IgG : Immunoglobuline G

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

ITS-1 : Internal Transcribed Spacer 1

m² : Mètre carré

mm : Millimètre

PAS : Periodic Acid Schiff

PCR : Polymerase Chain Reaction

ULV : Ultra Low Volume

UMR : Unité Mixte de Recherche

Contexte général de la thèse

L'objectif de cette thèse s'inscrit dans l'amélioration des moyens de lutte contre la besnoitiose bovine, par l'étude de certaines caractéristiques de *Stomoxys calcitrans*, vecteur de la maladie, et le développement de nouveaux pièges à mouche hématophage, plus abordables et écologiques, afin de limiter la propagation du principal vecteur de la besnoitiose. Elle fait suite à la thèse réalisée par Lucas Miquel, diplômé en 2023 de l'ENVT. Cette thèse s'intègre dans le projet « BioFlyTrap », porté par Marc Desquesnes, chercheur au CIRAD au sein de l'UMR InterTryp (CIRAD-IRD), en poste à l'ENVT au sein de l'équipe Gestion Intégrée des Parasites de ruminants (GIP) de l'UMR INRAE/ENVT 1225 Interactions Hôtes Agents Pathogènes. Les expérimentations ont pu être réalisées grâce à la collaboration avec les GDS (Groupement de Défense Sanitaire) du Tarn et d'Aveyron et à la participation de plusieurs éleveurs qui nous ont donné accès à leur élevage pour conduire nos expérimentations. Ces expérimentations ont également été permises par la contribution de Théotime Guiffroy et Mariana Ribeiro Sato au cours de leur stage au sein de l'équipe GIP d'IHAP sur le campus de l'ENVT.

Première partie : État des connaissances sur la besnoitiose

1. La besnoitiose bovine : aspects cliniques et épidémiologiques

La besnoitiose bovine est une maladie parasitaire causée par un protozoaire *Besnoitia besnoiti* (Apicomplexa, Sarcocystidae), parasite intracellulaire obligatoire se multipliant dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins sous forme de tachyzoïtes puis dans les histiocytes et fibroblastes (kystes à bradyzoïtes) (Jacquiet, Liénard, Franc 2010). Le cycle de *B. besnoiti* est mal connu car l'hôte définitif, probablement un carnivore, n'est pas identifié. Les voies de transmission sont mal comprises.

1.1. Signes cliniques de la besnoitiose

De nombreux bovins ne développent pas de signes cliniques et deviennent des porteurs latents asymptomatiques. Lorsque des signes cliniques se développent, trois phases successives sont à distinguer (Langenmayer et al. 2015 ; Jacquiet, Liénard, Franc 2010):

- La phase initiale, dite aigüe et fébrile, causée par la prolifération rapide des tachyzoïtes dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Les signes cliniques sont majoritairement de la fièvre et des écoulements nasaux et oculaires associés à des signes non spécifiques (anorexie, perte de poids, arrêt de transit...). Cette phase dure 3 à 10 jours, durant lesquels des avortements sporadiques et l'apparition de stérilité des taureaux (réversible ou non) peuvent survenir. Cette infertilité est expliquée par l'hyperthermie (dégénérescence des spermatogonies B et des spermatoocytes), par un défaut de thermorégulation due à l'hyperkératose du scrotum et la présence de kyste, et par l'atrophie des tubes séminifères et des conduits déférents consécutive aux lésions provoquées par les pseudo-kystes à tachyzoïtes.
- La phase anasarque, avec la présence d'œdème sous-cutané, surtout au niveau de la tête, du cou et des zones déclives. Elle se caractérise également par une hypertrophie des nœuds lymphatiques et une congestion de la peau accompagnés de chaleur et de douleur. Il est également observé une congestion sombre de la mamelle et des trayons, tandis que chez les taureaux, *B. besnoiti* provoque une orchite aiguë, caractérisée par des testicules

douloureux et une infertilité, transitoire ou permanente (Cortes et al. 2005). Cette phase dure entre 1 et 4 semaines et peut être mortelle.

- La phase finale ou phase chronique se caractérise par des signes cutanés marqués. Une sclérodermie, une hyperkératose et des dépilations apparaissent et provoquent un épaissement de la peau avec un exsudat séro-sanguin suintant. Des kystes parasitaires de petite taille, contenant des bradyzoïtes (Figure 1), se forment dans divers organes et tissus (appareil cardio-vasculaire, fascia, muqueuse de l'appareil respiratoire haut, conjonctive, testicules et épидидymes) et surtout dans le derme, où ils peuvent être superficiels ou profonds (Figure 2). Les kystes au niveau de la conjonctive sclérale sont pathognomoniques et se développent 6 à 7 semaines post-infection. Dans la majorité des cas les animaux atteignant cette phase de la maladie ont une faible valeur économique et sont envoyés à l'abattoir (Jacquiet, Liénard, Franc 2010).

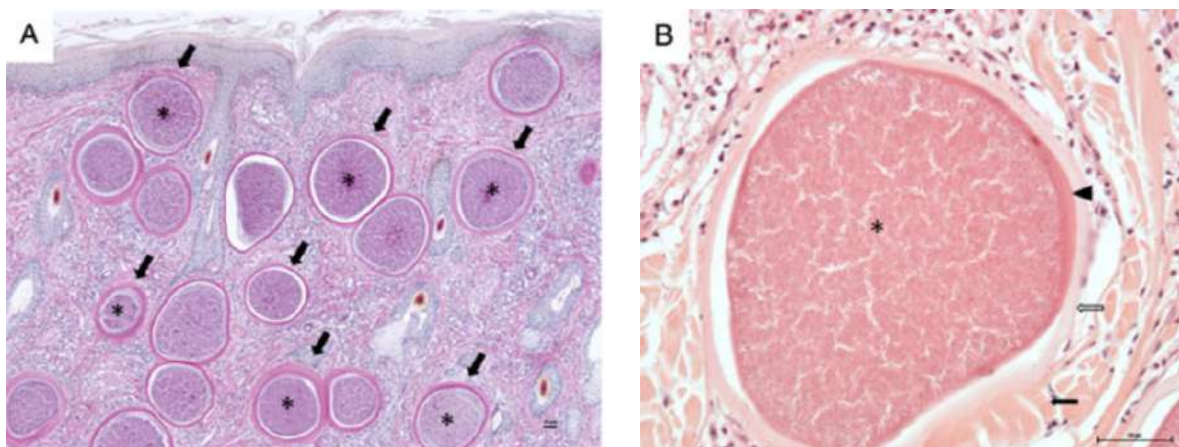


Figure 1 : Examens histopathologiques d'une biopsie cutanée (barre d'échelle 50 μ m) chez un bovin atteint de besnoitiose. (A) Kystes matures caractéristiques de *Besnoitia besnoiti* dans le derme, coloration au Periodic Acid Schiff (PAS), grossissement x40 ; (B) Kyste mature de *Besnoitia besnoiti* avec une paroi à trois couches, composée d'une paroi externe (flèche noire), moyenne (flèche claire) et interne (pointe de flèche), ainsi que de rares cellules géantes multinucléées (astérisque), coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H1E), grossissement x200. Barre d'échelle = 50 μ m (Zhou et al. 2020)

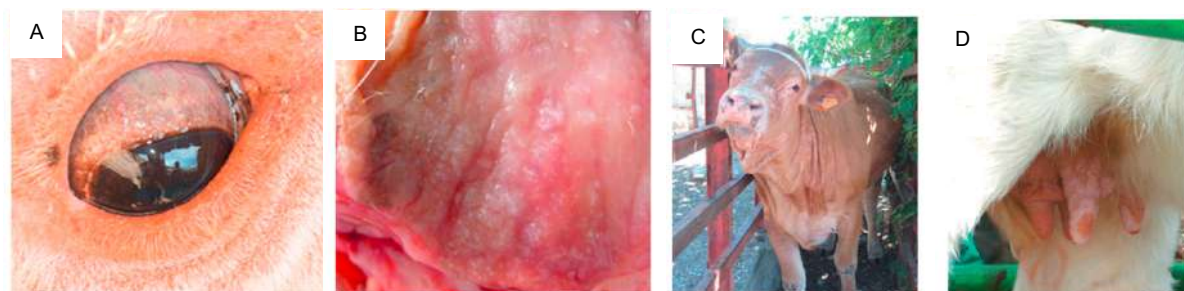


Figure 2 : Signes cliniques détectés en phase chronique de la besnoitiose. (A) Kystes dans la conjonctive sclérale. (B) kystes sur une biopsie de la vulve. (C) Peau d'éléphant et alopécie. (D) Nodules sur les mamelles et les trayons (Álvarez-García et al. 2013).

1.2. Épidémiologie de la besnoitiose

En Europe, cette maladie a été décrite pour la première fois dans le sud-ouest de la France et au Portugal à la fin du XIXe siècle (Álvarez-García et al. 2013). Aujourd'hui, la maladie est considérée comme ré-émergente par l'EFSA (*European Food Safety Authority*) avec une augmentation des cas dans les zones d'endémie historiques et son apparition dans des régions indemnes de plusieurs pays européens (France, Portugal, Espagne, Allemagne, Italie) (European Food Safety Authority 2010). En France, elle s'est propagée du sud au centre et à l'ouest. A l'échelle mondiale, la maladie est endémique en Afrique subsaharienne, en Asie (Kazakhstan, Ouzbékistan, Chine, Israël, Jordanie). Elle a également été observée au Venezuela (Figure 3).

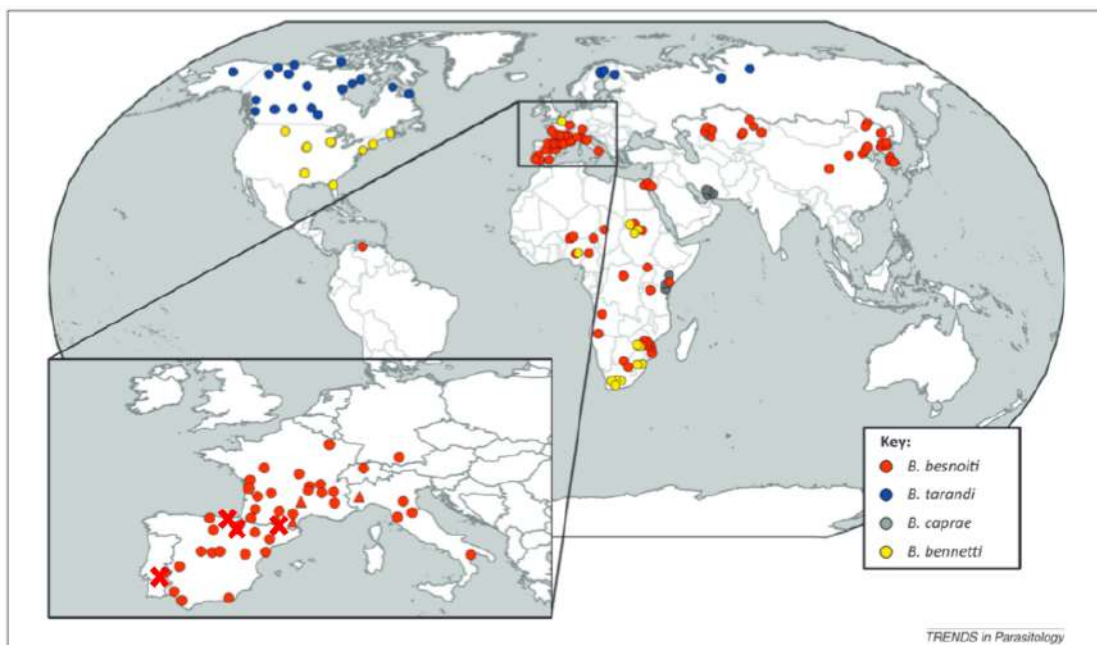


Figure 3 : Répartition mondiale des infections à *Besnoitia* spp chez les ongulés (Álvarez-García et al. 2013).

En rouge : *Besnoitia besnoiti* ; croix : avant 1900 ; triangle : 1991-2000 ; cercle : 2001-2012.

Différentes hypothèses sont avancées pour expliquer cette réémergence. L'importation de bovins porteurs semble être un facteur important de cette propagation. En effet, en Allemagne, un foyer est apparu suite à l'importation de bovins charolais et limousins provenant de France et suite à cela, 80% du troupeau d'origine a été infecté (European Food Safety Authority 2010). Certaines pratiques d'élevage, comme le partage des pâtures, les mises en pension et la transhumance, favorisent la transmission de la maladie (Álvarez-García et al. 2013). Le rallongement de la période estivale, dû au changement climatique qui conduit à un accroissement des populations d'arthropodes vecteurs de la maladie, favoriserait également la dissémination.

Malheureusement, il n'existe pas de médicament efficace et aucun vaccin n'a obtenu une autorisation de mise sur le marché en Europe (Álvarez-García et al. 2013; Müller et al. 2019 ; Eberhard et al. 2020). Dans cette situation, d'autres méthodes doivent être mises en place pour contrôler la propagation de la maladie.

2. Lutte contre la besnoitiose par dépistage et isolement/élimination des animaux infectés

2.1. Méthodes de dépistage

La besnoitiose étant une maladie non règlementée en France, il n'existe pas de plan de dépistage généralisé à ce jour. Des actions départementales et régionales existent toutefois pour sensibiliser à la reconnaissance clinique et au dépistage sérologique, en particulier dans les zones d'émergence (Alzieu, Jacquet, et al. 2020).

Du fait de l'absence de vaccin et de traitement efficace sur le marché, la lutte contre la besnoitiose implique la détection des individus séropositifs et leur réforme. La détection des bovins en phase clinique est facile mais reste à confirmer en laboratoire. En revanche, les bovins infectés asymptomatiques, qui peuvent être porteurs de kystes à bradyzoïtes en quantités diverses, demeurent un réservoir important et sont responsables de la dissémination de la maladie au reste du troupeau. Ces individus sont diagnostiqués séropositifs suite à une immunosérologie ELISA individuelle sur sérum ou lait, pouvant être assortie d'un *western blot* (Alzieu, Desclaux, et al. 2020), qui est une méthode plus spécifique (Figure 4). Un résultat ELISA négatif confère une très haute probabilité de non-infection par *B. besnoiti* mais il est intéressant de renouveler le sérodiagnostic 6 semaines après le 1^{er} dépistage du fait du délai d'apparition des anticorps (4 à 5 semaines post-infection) (Alzieu, Jacquet, et al. 2020).

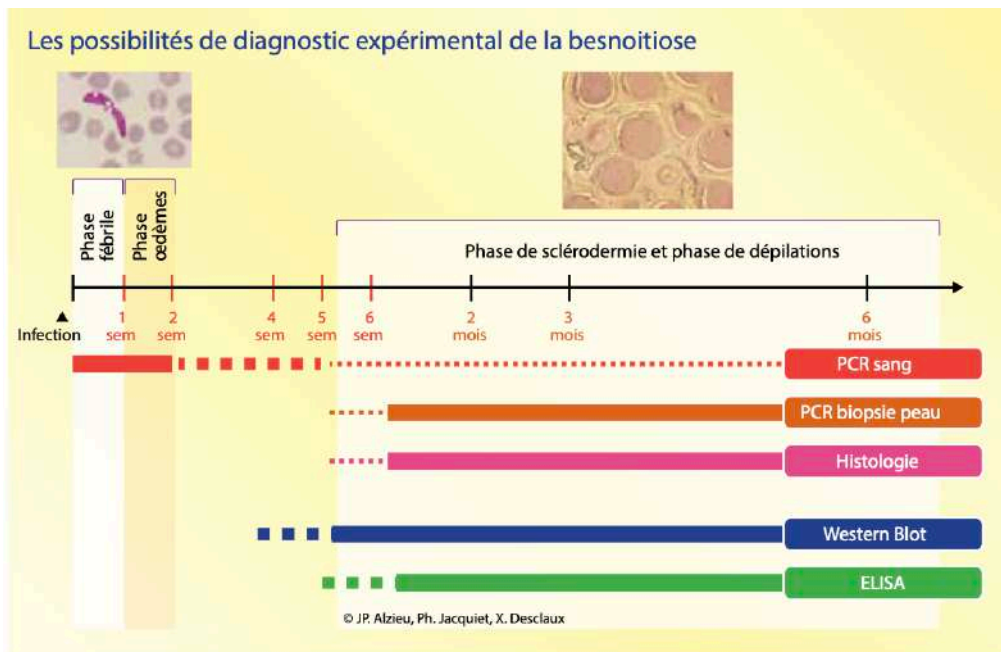


Figure 4 : Les possibilités de diagnostic expérimental de la besnoitiose (Alzieu et al. 2017).

L'adéquation des méthodes au regard des phases de la maladie est indiquée par : trait gras = optimale ; trait gras pointillé = sub-optimale ; trait pointillé = faible adéquation.

Tous les hôtes n'ont pas la même capacité à transmettre des agents pathogènes. Cette hétérogénéité dans la dynamique des maladies infectieuses est un phénomène courant, où une minorité de la population est responsable de la majorité des nouveaux cas (VanderWaal, Ezenwa 2016). Dans le cas de la besnoitiose, ce pouvoir de contamination serait proportionnel au nombre de kystes parasitaires dans la peau des bovins infectés (Alzieu, Jacquet, et al. 2020).

Une étude effectuée dans des élevages à forte prévalence (supérieur à 50%) a montré que la richesse du derme en ADN parasite et l'intensité de la réponse IgG spécifique évaluée en ELISA sont faiblement et positivement corrélés (Bottari 2019). La détection rapide et l'élimination précoce de « *super spreader* », individu à fort potentiel de contamination, ont montré des résultats encourageant dans le contrôle de la besnoitiose, en réduisant considérablement la diffusion du parasite dans un élevage (Alzieu, Desclaux, et al. 2020).

Une des manières d'évaluer la richesse du derme d'un animal en kystes parasitaires est de réaliser une PCR en temps réel sur un prélèvement de peau réalisé au *Biopsy Punch*® (Figure 5) (Bottari 2019).

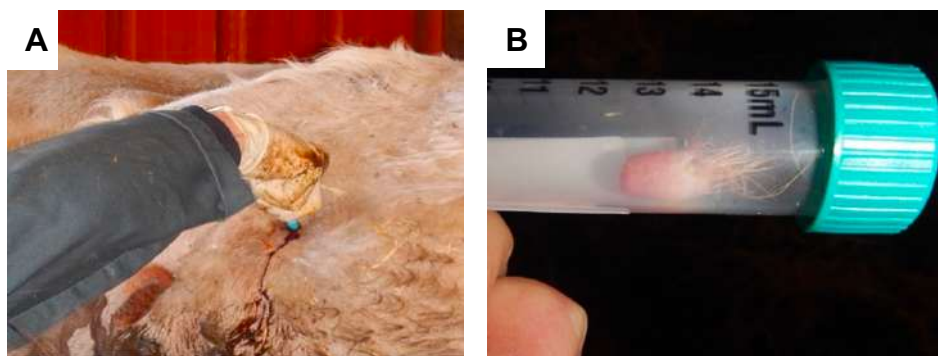


Figure 5 : (A) : Ponction à l'aide d'un Biopsy Punch[®] à la base de la queue ; (B) : Prélèvement de peau réalisé avec un Biopsy Punch[®] de 6-8 mm (Bottari 2019)

En 2020, trois localisations de prélèvements ont été comparées (base de la queue, cou, oreilles) chez des individus séropositifs et asymptomatiques (kystes non détectables à l'examen clinique). La base de la queue est la localisation où la PCR est positive dans la majorité des cas. L'analyse par PCR en temps réel sur des biopsies cutanées à la base de la queue pourrait donc constituer une bonne approche pour détecter, parmi les bovins asymptomatiques séropositifs, ceux considérés comme des « *super-spreader* » (Grisez et al. 2020). Pour ces animaux, la valeur de Ct (« *threshold cycle* » : nombre de cycles à partir duquel le signal est significatif) admise est inférieure à 36 (Grisez et al. 2020). Sur les individus en phase chronique sévère (avec des kystes facilement détectables dans le derme), les résultats PCR sont souvent univoques, avec des valeurs de Ct inférieures à 25, parfois entre 15 et 20 (Alzieu et al. 2017).

L'analyse par PCR en temps réel sur biopsie cutanée ne peut toutefois pas servir à qualifier un animal de « non transmetteur » du fait de l'existence de faux négatifs qui peuvent notamment être liés à la qualité de la PCR, mais également à la répartition hétérogène des kystes dermiques (Alzieu, Jacquet, et al. 2020 ; Bottari 2019).

2.2. Stratégies d'isolement et d'élimination

Les stratégies d'assainissement consistent à réformer d'abord les bovins avec des signes cliniques et les « *super-spreaders* », puis les subcliniques (porteurs de kystes oculaires visibles) et enfin les bovins asymptomatiques séropositifs (Figure 6). Ceci doit être associé au contrôle systématique des bovins à l'achat pour éviter la réintroduction de la maladie (Alzieu et al. 2017).

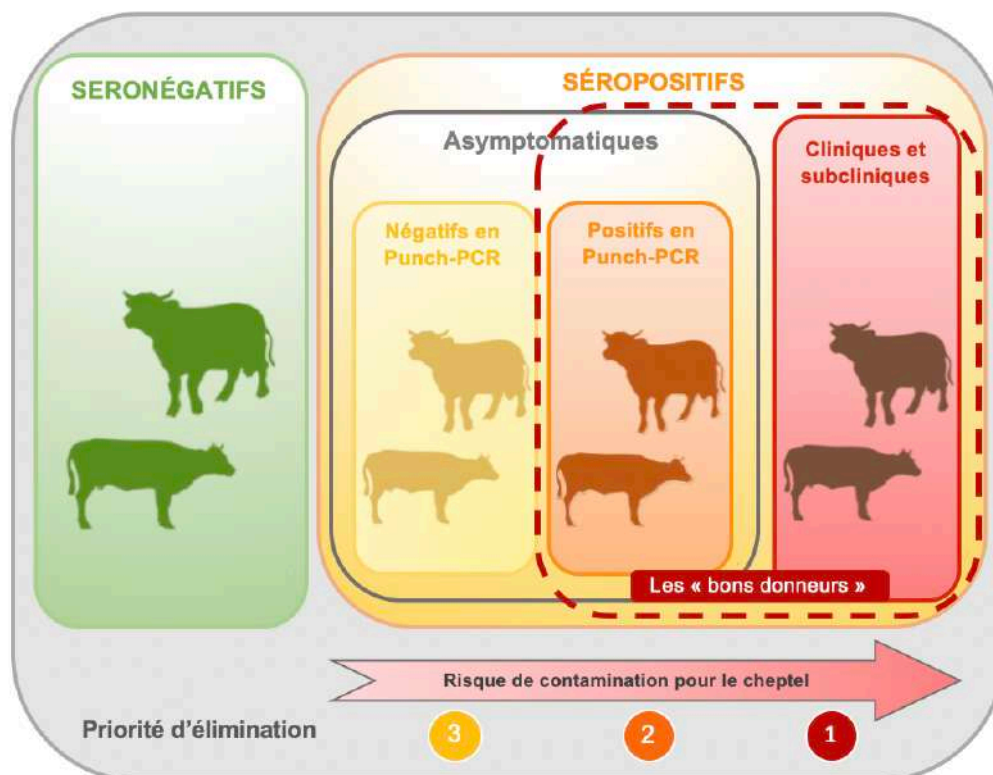


Figure 6 : Priorisation de l'élimination en fonction des différents profils de bovins présents dans un cheptel infecté (dérivé de sur Bottari 2019)

Les recommandations en termes de délais d'élimination dépendent de la séroprévalence du troupeau (Alzieu, Jacquet, et al. 2020). Pour les troupeaux à faible séroprévalence (<10%), la réforme de tous les bovins infectés doit être réalisée dans un délai le plus court possible, inférieur à 6 mois. Pour les élevages à plus forte prévalence, les bovins ayant présenté des signes cliniques doivent être réformés le plus tôt possible, si possible dans les 6 mois, et pour les bovins asymptomatiques séropositifs, l'élimination doit se réaliser idéalement dans un délai maximum de 2 à 3 ans.

Dans l'attente de l'élimination progressive des séropositifs, différents lots peuvent être constitués afin de séparer les individus séronégatifs des séropositifs, notamment en période estivale et automnale à haut risque du fait de la pullulation des insectes. La conduite adaptée consiste à séparer les lots de bovins avec une distanciation physique permanente de minimum 100 mètres et idéalement supérieure à 300 mètres.

La prévention dans les troupeaux présumés « sains » passe par le contrôle systématique de tout bovin introduit.

3. Lutte par neutralisation des vecteurs de la maladie

La transmission mécanique par l'insecte vecteur étant le mode de transmission exclusif de *B. besnoiti* (Alzieu et al. 2019), la neutralisation du vecteur de transmission de la maladie est un axe majeur de la lutte contre la besnoitiose. Elle se décline de différentes manières : piégeage, lutte chimique, environnementale et biologique.

3.1. Importance des mouches hématophages : illustration par le cas de *Stomoxys calcitrans*

3.1.1. Présentation générale et aspect morphologique

Le genre *Stomoxys* (Diptera, Muscidae) contient 18 espèces décrites, dont *S. calcitrans* est la seule espèce cosmopolite (Baldacchino et al. 2013).

Ce sont des insectes piqueurs hématophages obligatoires qui, pour certaines espèces, ont des impacts économiques importants. *Stomoxys calcitrans* se trouve préférentiellement près des étables, ce qui lui vaut communément d'être appelé « *stable fly* » ou mouche d'étable. Elle mesure entre 5 et 10 mm de longueur et se distingue des mouches domestiques par la présence d'un appareil piqueur et d'une nervation alaire différente (Duvallat 2023) (Figure 7). Le proboscis, ou trompe, est orienté vers l'avant dans l'axe du corps et est capable de percer la peau. Il est constitué de trois pièces longues et fortement sclérifiées, non rétractiles : le labium (lèvre inférieure), le labre (lèvre supérieure) et l'hypopharynx, formant ensemble deux tubes (Figure 8). La salive est injectée dans le derme de l'hôte par le canal salivaire contenu dans l'hypopharynx, tandis que le sang est prélevé par un tube constitué entre le labre et la partie dorsale de l'hypopharynx. Les mâles et les femelles se nourrissent de sang et sont souvent agressifs et persistants.



Figure 7 : Aspect général de *Stomoxys calcitrans* en vue dorsale à gauche et latérale à droite (photographies originales). La tête de flèche désigne l'appareil piqueur des stomoxes.

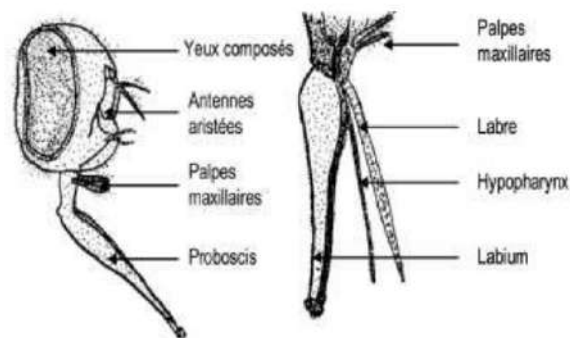


Figure 8 : Vues latérales de la tête et des pièces buccales de *Stomoxys* sp. (Duvallat 2023)

Ces insectes sont responsables d'un harcèlement des animaux. Plusieurs actions comme leur vol autour des yeux, leur présence sur la peau et leur pique, perturbent le bétail et induisent des mouvements de défense de la tête, des oreilles, de la peau, des pattes et de la queue, ainsi que des comportements de fuite ou de cachette (Baldacchino et al. 2013). Cela entraîne une perte d'énergie, une réduction du temps consacré à l'alimentation et l'apparition d'un stress. Une forte activité de mouches d'étables peut entraîner une réduction de 19% du gain de poids chez les bovins en pâturage (Campbell et al. 2001). *Stomoxys calcitrans* est également responsable de troubles cutanés dus aux piqûres comme des dermatites nécrotiques chez les chiens, des dermatites exsudatives chez les chevaux et des dermatites sur le dos des veaux (Yeruham, Braverman 1995). Ces lésions se situent au niveau des sites préférentiels des piqûres que sont les membres inférieurs des chevaux et des bovins (Salem et al. 2012).

Les stomoxes peuvent également s'attaquer aux humains en l'absence d'hôtes préférentiels (bovins, chevaux). Ils ont un réel impact économique par leur action directe de nuisibles et indirecte en agissant comme vecteurs de maladie.

3.1.2. *Stomoxys calcitrans*, vecteur dans la transmission de nombreuses maladies

Lors d'un repas de sang, les pièces buccales se souillent du sang du bovin infecté, ainsi que des tissus du site de la piqûre. Ainsi des bradyzoïtes et tachyzoïtes présents dans la peau ou le sang des bovins infectés sont prélevés. Il a été montré que le parasite ne se multiplie pas au sein des stomoxes (Liénard et al. 2013) qui agissent donc comme simples vecteurs mécaniques.

Les mouches hématophages ont une action dans la propagation de maladies vectorielles. En effet, plusieurs espèces de stomoxes sont impliquées comme vecteurs mécaniques d'agents pathogènes, y compris de virus, de bactéries, de protozoaires et de parasites. *Stomoxys calcitrans* a ainsi un rôle épidémiologique majeur dans la transmission des maladies vectorielles, notamment pour la fièvre porcine africaine, la trypanosomose ou encore les fièvres à West Nile (Baldacchino et al. 2013).

Les conditions requises à la transmission sont un repas de sang interrompu à la suite duquel les stomoxes doivent reprendre le cours de leur repas de sang sur un autre individu, transmettant ainsi du sang infecté via leurs pièces buccales. La transmission à l'intérieur d'un même troupeau est alors permise.

Dans le cas de la besnoitiose, il est désormais acquis que la transmission de *B. besnoiti* se réalise exclusivement par l'insecte vecteur (Alzieu, Desclaux, et al. 2020). La transmission mécanique par *S. calcitrans* a été démontrée (Liénard et al. 2013). Sa présence est un facteur de risque dans la propagation rapide de la maladie. Des études sont encore en cours pour mieux caractériser son rôle dans la transmission de cette maladie. En 2019, une étude a permis d'observer qu'après un repas de sang sur les vaches chroniquement infectées, suivi d'un autre repas sur des lapins, l'ADN du parasite a pu être détecté dans les tissus d'un lapin présentant les signes cliniques de la phase aiguë (Sharif et al. 2019).

3.1.3. Modalités de la transmission de la besnoitiose

La transmission de la besnoitiose implique plusieurs étapes : i) repas sanguin sur un animal infecté, interrompu (le plus souvent par une réaction de défense de l'hôte) ; ii) transfert de la mouche vers un nouvel hôte et transmission des pathogènes sanguins et/ou dermiques provenant du premier hôte par l'intermédiaire des pièces buccales (Baldacchino et al. 2013). Les agents pathogènes sont ainsi transmis par contamination du site de piqûre et/ou par la salive que les insectes hématophages injectent avant la prise de sang. Une étude expérimentale a par ailleurs montré que *S. calcitrans* est capable de régurgiter une partie d'un repas sanguin précédent avant d'en prendre un autre (Butler et al. 1977), ce qui pourrait également contribuer à la transmission. Des parasites entiers mobiles ont été observés dans les abdomens (probablement localisés dans l'intestin) et les pièces buccales de *S. calcitrans* jusqu'à 48h après le premier repas de sang. Au-delà de ce délai, seules des traces d'ADN du parasite ont été retrouvées dans certains contenus abdominaux de stomoxes. Cette destruction rapide des bradyzoïtes suggère que la transmission mécanique ne peut avoir lieu que lorsque les repas sanguins sur deux individus sont proches (Sharif et al. 2017). Par ailleurs la charge parasitaire au niveau de la peau des bovins, site de la piqure, influe sur l'efficacité de la transmission: des bovins à forte charge parasitaire au niveau du derme, nommés « supers-contaminateurs » (« *super-spreader* »), favoriseraient la transmission (Grisez et al. 2020).

3.2. Lutte par piégeage

Ce moyen de lutte consiste à attirer des insectes adultes dans des pièges grâce à leur couleur, leur odeur, leur contraste, leur mouvement et/ou leur polarisation lumineuse. Le piégeage représente un outil d'étude et de surveillance, mais également de lutte écologique efficace contre certains vecteurs.

Il existe plusieurs types de pièges utilisés pour capturer les stomoxes.

Le piège Vavoua est l'un des plus répandus. Il a été initialement créé pour la capture de glossines en Afrique, dans la zone forestière de Vavoua en Côte d'Ivoire, afin de lutter contre la trypanosomose (Laveissière, Grébaut 1990). Il est composé de trois écrans se coupant à 120°. Ces écrans sont bicolores avec une partie externe bleue, et une partie centrale noire (Figure 9). L'attractivité est réalisée grâce au contraste créé par les couleurs bleues et noires des tissus utilisés. La partie supérieure est composée d'un cône en tulle de moustiquaire en polyester ou en nylon. Ce piège n'est pas biodégradable, est difficilement disponible et n'est accessible qu'à un tarif relativement élevé.



Figure 9 : Piège Vavoua (Bouyer et al. 2005)

Son efficacité dans la capture des stomoxes a largement été démontrée (Mihok et al. 1995 ; Gilles et al. 2007).

Le piège Nzi est dérivé d'un autre piège à glossines, le piège Nguruman NG2G (Brightwell, Dransfield, Kyorku 1991). Il a une forme triangulaire avec 3 panneaux bleus (d'une surface totale de 1,5m²) et 2 panneaux noirs de 0,5 m² chacun (Figure 10). Ce piège permet la capture de Tabanidae et de Stomoxyinae (Mihok 2002, Gilles et al. 2007). Il est moins économique que le piège Vavoua et plus complexe à utiliser, mais également plus performant.



Figure 10 : Piège Nzi (Bouyer et al. 2005)

Les pièges Nzi et Vavoua ont en commun l'utilisation de panneaux bleus et noirs. La couleur « bleu phthalogène », obtenue par des procédés de coloration de

tissus en coton ou coton mélangé à l'aide d'un pigment bleu (phthalocyanine de cuivre) apparaît comme la couleur optimale d'attractivité des glossines (Lindh et al. 2012). La réponse à la couleur bleue pourrait rappeler, au moins en partie, la réflexion de la lumière sur le poil des hôtes naturels. Les parties noires, elles, représenteraient l'ombre sous les animaux car les mouches hématophages passent sous les animaux lors de leur repérage avant de se poser. Des expériences en laboratoire ont démontré que le contraste des couleurs peut attirer *S. calcitrans* (Murchie et al. 2018). La nature des écrans bleus influence également l'attractivité. Les écrans en polyéthylène bleu (longueur d'onde autour de 460 nm) se sont avérés très attractifs pour les mouches d'étable, en comparaison avec des tissus coton ou coton mélangé bleus plus coûteux (Sharif et al. 2020). Le polyester peut également être utilisé, comme dans les pièges et écrans proposés par la compagnie Vestergaard.

3.3. Lutte par procédés chimiques

Les insectes hématophages à la recherche d'un hôte font également appel à leur odorat et réagissent à certaines odeurs. Une étude met en évidence l'attrait de *S. calcitrans* pour 30 composants volatils de l'odeur du rumen, notamment le diméthyl trisulphide (Jeanbourquin, Guerin 2007). Ces molécules sont également présentes dans d'autres milieux, notamment dans les fèces de vache, substrats utilisés pour la ponte des femelles.

Des études ont été effectuées pour démontrer l'effet de plusieurs attractifs olfactifs afin d'augmenter le rendement de capture d'un piège. Il a été montré que le 1-octène-3-ol libéré à raison de 0,2-2,0 mg/h permet d'accroître significativement le taux de capture des *Stomoxys spp* par le piège Vavoua (Mihok, Kang'ethe, Kamau 1995).

Historiquement, l'utilisation d'insecticides constitue le pilier de la lutte contre les mouches hématophages. L'apparition de leur utilisation dans la littérature date du début des années 1900. La pratique a évolué en passant des organochlorés, dont le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) aux organophosphorés puis aux pyréthriinoïdes, utilisés tant sur les animaux que dans les environnements où les mouches se reproduisent (Cook 2020).

Aujourd'hui, les principales molécules utilisées sont des pyréthriinoïdes, souvent de la perméthrine pour les surfaces et de la deltaméthrine pour les applications topiques. Différentes formes galéniques sont disponibles. Ces molécules peuvent être

appliquées sous forme de pulvérisations sur l'animal, en « *pour-on* » à appliquer le long de la ligne du dos des bovins ou en pulvérisation à l'intérieur et à l'extérieur des bâtiments en ciblant les sites de repos des stomoxes. La lutte peut être également réalisée par le traitement par zones avec des insecticides à très faible volume (*ULV = Ultra Low Volume*) mais avec une action courte de moins de 24 heures (Rochon et al. 2021). Dans la technique ULV, l'épandage du produit se fait au moyen d'un dispositif tournant à grande vitesse, sur lequel tombe une mince veine liquide de la solution à pulvériser, qui se résous en un très grand nombre de gouttelettes régulières dispersés sur des grandes distances. Cette technique permet une économie d'eau et une facilité d'utilisation par un épandage de la solution insecticide sans adjonction d'eau ou d'autre diluant (S. Wood 1999).

Des alternatives aux insecticides apparaissent. Par exemple, des formulations répulsives à base d'acide gras d'huile de coco sont testées avec une stratégie dite de « *push-pull* ». Cette méthode repose sur une combinaison de techniques pour repousser (« *push* ») les mouches d'étable loin du bétail, ici avec une formulation répulsive à base d'acide gras d'huile de coco, et pour les attirer (« *pull* ») à l'aide de leurres attractifs dans des pièges localisés à distance des troupeaux. Cette méthode est prometteuse avec une durée d'efficacité et une réduction des populations équivalente à celle de la perméthrine (Lehmann et al. 2023).

La lutte chimique présente toutefois des limites. L'exposition des mouches d'étable aux insecticides appliqués sur le bétail est limitée par le comportement alimentaire des mouches. Comme vu précédemment, le repas de sang se réalise préférentiellement sur les membres inférieurs des bovins où les insecticides sont moins présents et donc leur efficacité diminuée. Les insecticides peuvent donc être appliqués sur les murs des étables où les mouches passent beaucoup de leur temps en dehors du repas de sang, mais ceci augmente la pression sélective sur les populations et est un facteur menant à l'apparition de chimiorésistance.

La résistance d'une espèce aux insecticides représente une diminution héréditaire de sa sensibilité à ces substances (Nauen 2007). Cette résistance résulte de l'adaptation au nouvel environnement induite par la pression exercée par les insecticides, via un processus de sélection naturelle. Les individus résistants portent alors des mutations géniques, appelées allèles de résistance, qui codent des protéines

interférant avec le mécanisme d'action de l'insecticide. Ces protéines mutées empêchent l'insecticide d'atteindre sa cible, permettant ainsi aux insectes porteurs de survivre à des doses normalement létales. L'utilisation intensive des insecticides conduit à la sélection de mouches porteuses de ces mutations, ce qui augmente la fréquence des allèles de résistances dans les populations exposées, pouvant même conduire à une résistance croisée ou multiple si différents insecticides sont utilisés (Whalon, Mota-Sanchez, Hollingworth 2009). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini des critères de résistance aux pyréthrinoïdes selon la mortalité d'une espèce induite par l'exposition à un insecticide : entre 98 et 100%, l'espèce est sensible, entre 90 et 97% la résistance est suspectée et en dessous de 90%, la résistance est avérée (Tainchum et al. 2018).

La résistance aux pyréthrynoïdes a été signalée dans plusieurs parties du monde. Dans les troupeaux laitiers du Brandebourg en Allemagne, une résistance de 100% des mouches d'étables à la deltaméthrine a été révélée (Reissert-Oppermann et al. 2019). Un constat similaire a été fait pour la cyperméthrine dans le centre Ouest du Brésil (Barros et al. 2019) et pour la perméthrine en Floride, avec un taux de survie entre 21 et 57% (Pitzer, Kaufman, Tenbroeck 2010).

En 2019, une étude sur 5 populations sauvages de *S. calcitrans* du sud-ouest de la France a révélé une mauvaise efficacité des pyréthrinoïdes (deltaméthrine et cyperméthrine) aux doses recommandées par les fabricants. Cette étude indique aussi une efficacité globalement complète des insecticides à base de phoxime (organophosphoré), administrés par bain ou pulvérisation sur les ruminants. Ces insecticides sont peu utilisés par les éleveurs, préférant les pyréthrynoïdes pour leur effet prolongé. L'utilisation réduite des insecticides à base de phoxime a probablement permis de conserver leur efficacité (Tainchum et al. 2018).

L'impact environnemental constitue une autre limite de la lutte chimique. De nombreuses études soulignent une écotoxicité des insecticides utilisés. En Australie, des chercheurs ont démontré la toxicité de nombreux ectoparasitocides, en particulier les pyréthrinoïdes, pour les larves de mouches et de bousiers adultes. Les organophosphorés, comme le phoxime, sont métabolisés et éliminés principalement dans l'urine. Ils sont donc considérés comme ayant peu d'impact sur les organismes vivant dans les excréments et donc plus largement sur l'environnement. Cette étude identifie également de nombreuses lacunes dans nos connaissances et dans notre

compréhension du devenir dans l'environnement de ces molécules (Wardhaugh 2005). De nouvelles études cherchent à combler ce manque d'information, comme celle réalisée sur la perméthrine en 2021 montrant une extrême nocivité pour l'environnement, après ozonolyse (Huo et al. 2021).

3.4. Lutte par action sur l'environnement

La lutte environnementale se base sur le contrôle des lieux de ponte et de vie des stomoxes. Les stomoxes se développent dans du fumier, de la matière organique en décomposition et également dans les biosolides résultant des eaux usées de l'activité humaine (Doud, Taylor, Zurek 2012). La matière organique en décomposition, seule ou en association avec diverses déjections animales, est le milieu de prédilection du développement des larves (Cook et al. 2018). Il est donc important d'enlever régulièrement les refus de foin et la litière, et d'avoir un stockage permettant un séchage optimal des déchets et du fumier (Rochon et al. 2021). La litière souillée devrait être enlevée de manière appropriée chaque semaine. Les matériaux enlevés doivent être étalés finement (moins de 5 centimètres d'épaisseur) et compostés. Le fumier empilé peut être retourné une ou deux fois par mois, le compostage sera alors accéléré et les mouches qui se développent seront déplacées vers l'intérieur de la pile où les températures seront trop élevées pour leur survie (Pickens, Schmidtman, Miller 1994). Ce traitement rationnel du fumier est toutefois contraignant et rarement pleinement appliqué.

Si l'enlèvement n'est pas possible, il est envisageable d'utiliser un régulateur de croissance des insectes (Rochon et al. 2021). Par exemple, il est possible d'utiliser du bisulfate de sodium pour limiter le développement larvaire. Il a pour effet de diminuer la concentration d'ammoniac, abaissant le pH de la litière, créant ainsi un environnement dans lequel les bactéries ne peuvent se développer (Sweeney et al. 2000). La cyromazine est un régulateur de croissance qui empêche les mues larvaires et qui peut être pulvérisé sur les litières dans les bâtiments d'élevages. Son utilisation doit être raisonnée et réservée à des situations exceptionnelles, comme des exploitations particulièrement à risque, du fait de son potentiel effet sur l'entomofaune (Hoste et al. 2023). Le pyriproxyfène est également un régulateur de croissance qui agit sur la métamorphose des insectes en imitant l'activité de l'hormone juvénile, empêchant les insectes d'atteindre la maturité et donc de se reproduire (Devillers

2020a). Il a ainsi une forte efficacité contre les stades immatures de stomoxes lorsque les larves se développent dans du fumier traité (Liu et al. 2012). Plusieurs études ont néanmoins montré une toxicité importante du pyriproxifène pour les écosystèmes aquatiques et terrestres (Devillers 2020a ; Devillers 2020b). Par exemple, une exposition orale de 28 jours a entraîné une réduction du poids du corps et des organes chez les souris adultes mâles (Shahid et al. 2019).

Il est également possible d'agir avec l'installation d'un système d'approvisionnement en eau efficace et sans fuite avec un bon drainage pour limiter l'accumulation d'eau usée et réduire l'humidité dans l'environnement. Le choix de la litière a également un impact : le sable, le gravier et la sciure de bois sont moins propices au développement des stomoxes, tandis que la paille, le maïs et les tiges de soja le sont davantage (Rochon et al. 2021).

3.5. Lutte par procédés biologiques

La lutte biologique consiste à contrôler les populations de stomoxes en utilisant leurs prédateurs naturels, comme les guêpes parasitoïdes qui sont naturellement présentes dans les élevages. Elles tuent les stades immatures des mouches et sont inoffensives pour l'homme et le bétail (Pickens, Schmidtman, Miller 1994). D'autres espèces sont disponibles pour le contrôle des stomoxes, comme l'hyménoptère *Muscidifurax raptorellus* (Frank, Thomas 1969) ou l'acarien *Macrocheles embersoni*, qui ont montré un fort potentiel en tant qu'agents de lutte contre *S. calcitrans* (Azevedo et al. 2018).

Cette méthode de lutte n'est pas 100% efficace et nécessite un temps de mise place. Elle est donc à mettre en application conjointement à d'autres méthodes. Pour améliorer son efficacité, il est nécessaire d'éviter l'utilisation d'insecticides, notamment les pyréthrinoïdes (Pickens, Schmidtman, Miller 1994).

Une approche intégrée combinant piégeage, lutte environnementale et biologique a été récemment testée en Espagne (González et al. 2024). Cette stratégie combine des pratiques culturelles, la protection des animaux pour éviter le contact direct des piqûres (tapis de protection, masques faciaux, jambières en mailles et bottes anti-mouches), le lâcher d'ennemis naturels ciblant les stades immatures (acariens

prédateurs et deux espèces de guêpes parasitoïdes), et un système de piégeage (ciblant les adultes). Elle est présentée comme une méthode respectueuse de l'environnement visant à réduire l'utilisation d'insecticides traditionnels, tout en améliorant le bien-être du bétail et la santé de l'écosystème.

Références bibliographiques

ÁLVAREZ-GARCÍA, G., FREY, C. F., MORA, L. M. O. et SCHARES, G., 2013. A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends in Parasitology*. 2013. Vol. 29, n° 8, pp. 407-415. DOI 10.1016/j.pt.2013.06.002.

ALZIEU, J-P., DESCLAUX, X., PEREZ, L., JACQUIET, P., PREVOT, F., GRISEZ, C., BOTTARI, L., BOULON, L., MEJEAN, F., LACZ, C., PAILLAS, J-M et LOCATELLI, C., 2020. Besnoitiose : le panel diagnostique s'étoffe. *LA SEMAINE VÉTÉRINAIRE • nos 1851 et 1852*.

ALZIEU, J-P, JACQUIET, P., BOULON, C., DEVOS, J., LEMAIRE, M., DESCLAUX, X., RAMEIL, M., GRISEZ, C. et MEJEAN, F., 2020. La besnoitiose bovine : stratégies de prévention et d'assainissement en cheptels infectés.

ALZIEU, J-P, JACQUIET, P., BOULON, C., MEJEAN, F., DESCLAUX, X., PREVOT, F., FRANC, M., RAMEIL, M., GRISEZ, C., MALAVIEILLE, R., BOUHSIRA, E. et LIÉNARD, E., 2017. La besnoitiose bovine : moyens de diagnostic et stratégies possibles de contrôle. *Bulletin des GTV - N°85*.

AZEVEDO, L. H., FERREIRA, M. P., CASTILHO, R., CANÇADO, P. et DE MORAES, G., 2018. Potential of *Macrocheles* species (Acari: Mesostigmata: Macrochelidae) as control agents of harmful flies (Diptera) and biology of *Macrocheles embersoni* Azevedo, Castilho and Berto on *Stomoxys calcitrans* (L.) and *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Biological Control*. Vol. 123, pp. 1-8. DOI 10.1016/j.biocontrol.2018.04.013.

BALDACCHINO, F., MUENWORN, V., DESQUESNES, M., DESOLI, F., CHAROENVIRIYAPHAP, T. et DUVALLET, G., 2013. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*. Vol. 20, pp. 26. DOI 10.1051/parasite/2013026.

BARROS, A., RODRIGUES, V., CANÇADO, P. et DOMINGUES, L., 2019. Resistance of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), to cypermethrin in outbreak areas in Midwestern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. Vol. 28, n° 4, pp. 802-806. DOI 10.1590/s1984-29612019089.

BOTTARI, L., 2019. La besnoitiose bovine : utilisation de la biopsie cutanée comme un outil diagnostique des individus forts contaminateurs et stratégie d'assainissement des troupeaux à forte séroprévalence. Thèse d'exercice Médecine vétérinaire. Université Toulouse 3 Paul Sabatier.

BOUYER, J., DESQUESNES, M., DIA, M., KABORÉ, I. et GILLES, J., 2005. Le

- piégeage des insectes vecteurs. *CIRDES. Santé animale en Afrique de l'Ouest*. mars 2005. Fiche n°20.
- BRIGHTWELL, R., DRANSFIELD, R. D. et KYORKU, C., 1991. Development of a low-cost tsetse trap and odour baits for *Glossina pallidipes* and *G. longipennis* in Kenya. *Medical and Veterinary Entomology*. 1991. Vol. 5, n° 2, pp. 153-164. DOI 10.1111/j.1365-2915.1991.tb00536.x.
- BUTLER, J. F., KLOFT, W. J., DUBOSE, L. A. et KLOFT, E. S., 1977. Recontamination of Food After Feeding a 32P Food Source to Biting Muscidae¹, 2. *Journal of Medical Entomology*. 1977. Vol. 13, n° 4-5, pp. 567-571. DOI 10.1093/jmedent/13.4-5.567.
- CAMPBELL, J, SKODA, S., BERKEBILE, D.R., BOXLER, D., THOMAS, G, ADAMS, D et DAVIS, R, 2001. Effects of Stable Flies (Diptera: Muscidae) on Weight Gains of Grazing Yearling Cattle. *Journal of economic entomology*. 2001. Vol. 94, pp. 780-3. DOI 10.1603/0022-0493-94.3.780.
- COOK, D., 2020. A Historical Review of Management Options Used against the Stable Fly (Diptera: Muscidae). *Insects*. 2020. Vol. 11, n° 5, pp. 313. DOI 10.3390/insects11050313.
- COOK, D. F, TELFER, Don V, LINDSEY, J. B et DEYL, Robert A, 2018. Substrates across horticultural and livestock industries that support the development of stable fly, *STOMOXYS CALCITRANS* (Diptera: Muscidae). *Austral Entomology*. 2018. Vol. 57, n° 3, pp. 344-348. DOI 10.1111/aen.12282.
- CORTES, H., LEITÃO, A., VIDAL, R., VILA-VIÇOSA, M. J., FERREIRA, M. L., CAEIRO, V. et HJERPE, C. A., 2005. Besnoitiosis in bulls in Portugal. *Veterinary Record*. 2005. Vol. 157, n° 9, pp. 262-264. DOI 10.1136/vr.157.9.262.
- DEVILLERS, J., 2020a. Fate and ecotoxicological effects of pyriproxyfen in aquatic ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020. Vol. 27, n° 14, pp. 16052-16068. DOI 10.1007/s11356-020-08345-8.
- DEVILLERS, J., 2020b. Fate of Pyriproxyfen in Soils and Plants. *Toxics*. 13 mars 2020. Vol. 8, n° 1, pp. 20. DOI 10.3390/toxics8010020.
- DOUD, C. W., TAYLOR, D. B. et ZUREK, L., 2012. Dewatered Sewage Biosolids Provide a Productive Larval Habitat for Stable Flies and House Flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*. 2012. Vol. 49, n° 2, pp. 286-292. DOI 10.1603/ME11158.
- DUVALLET, G., 2023. Stomoxes : nuisance, vecteurs potentiels et lutte intégrée. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* [en ligne]. 2023. Vol. 176. DOI 10.3406/bavf.2023.71061. Disponible à l'adresse : https://academie-veterinaire-defrance.org/fileadmin/user_upload/Publication/Bulletin-AVF/BAVF_2023/Duvallet_stomoxes_bavf_2023.pdf
- EBERHARD, N., BALMER, V., MÜLLER, J., MÜLLER, N., WINTER, R., POU, S., NILSEN, A., RISCOE, M., FRANCISCO, S., LEITAO, A., DOGGETT, J. Stone et HEMPHILL, A., 2020. Activities of Endochin-Like Quinolones Against in vitro Cultured *Besnoitia besnoiti* Tachyzoites. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020. Vol. 7, pp. 96. DOI 10.3389/fvets.2020.00096.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2010. Bovine Besnoitiosis: An emerging disease in Europe. *EFSA Journal* [en ligne]. 2010. Vol. 8, n° 2. DOI 10.2903/j.efsa.2010.1499. Disponible à l'adresse : <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2010.1499>

FRANK, J. Howard et THOMAS, M. C., 1969. Rove Beetles of the World, Staphylinidae (Insecta: Coleoptera: Staphylinidae). *EDIS* [en ligne]. 1969. Vol. 2002, n° 8. [Consulté le 24 avril 2024]. DOI 10.32473/edis-in271-2002. Disponible à l'adresse : <https://journals.flvc.org/edis/article/view/108401>

GILLES, J., DAVID, J.-F., DUVALLET, G., DE LA ROCQUE, S. et TILLARD, E., 2007. Efficiency of traps for *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger niger* on Reunion Island. *Medical and Veterinary Entomology*. 2007. Vol. 21, n° 1, pp. 65-69. DOI 10.1111/j.1365-2915.2006.00658.x.

GONZÁLEZ, M. A., DUVALLET, G., MOREL, D., DE BLAS, I., BARRIO, E. et RUIZ-ARRONDO, I., 2024. An Integrated Pest Management Strategy Approach for the Management of the Stable Fly *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Insects*. 2024. Vol. 15, n° 4, pp. 222. DOI 10.3390/insects15040222.

GRISEZ, C., BOTTARI, L., PRÉVOT, F., ALZIEU, J.-P., LIÉNARD, E., CORBIÈRE, F., RAMEIL, M., DESCLAUX, X., LACZ, C., BOULON, C., PETERMANN, J., LE MÉVEL, J., VILARDELL, C. et JACQUIET, P., 2020. Real-time PCR on skin biopsies for super-spreaders' detection in bovine besnoitiosis. *Parasites & Vectors*. 2020. Vol. 13, n° 1, pp. 529. DOI 10.1186/s13071-020-04405-7.

HOSTE, H., RAVINET, N., CHARTIER, C., MARIE-MAGDELEINE, C., BAMBOU, J.-C., BONNEAU, M., MANDONNET, N., JACQUIET, P. et DESQUESNES, M., 2023. Réduction d'usage et alternatives aux antiparasitaires en élevage des ruminants. *INRAE Productions Animales*. 2023. pp. 327-344. DOI 10.20870/productions-animales.2022.35.4.7333.

HUO, Y., LI, Mingxue, AN, Z., SUN, J., MEI, Q., WEI, B., QIU, Z., XIE, J. et HE, M., 2021. Ozonolysis of Permethrin in the Atmosphere: Mechanism, Kinetics, and Evaluation of Toxicity. *The Journal of Physical Chemistry*. 2021. Vol. 125, n° 35, pp. 7705-7715. DOI 10.1021/acs.jpca.1c04812.

JACQUIET, P., LIÉNARD, E. et FRANC, M., 2010. Bovine besnoitiosis: Epidemiological and clinical aspects. *Veterinary Parasitology*. 2010. Vol. 174, n° 1-2, pp. 30-36. DOI 10.1016/j.vetpar.2010.08.013.

JEANBOURQUIN, P. et GUERIN, P. M., 2007. Sensory and behavioural responses of the stable fly *Stomoxys calcitrans* to rumen volatiles. *Medical and Veterinary Entomology*. 2007. Vol. 21, n° 3, pp. 217-224. DOI 10.1111/j.1365-2915.2007.00686.x.

LANGENMAYER, M. C., GOLLNICK, N. S., SCHARR, J. C., SCHARES, G., HERRMANN, D. C., MAJZOUB-ALTWECK, M. et HERMANN, W., 2015. Besnoitia besnoiti infection in cattle and mice: ultrastructural pathology in acute and chronic besnoitiosis. *Parasitology Research*. 2015. Vol. 114, n° 3, pp. 955-963. DOI 10.1007/s00436-014-4261-6.

LAVEISSIÈRE, C. et GRÉBAUT, P., 1990. The trapping of tsetse flies (Diptera:

Glossinidae). Improvement of a model: the Vavoua trap. *Tropical medicine and parasitology: official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)*. 1990. Vol. 41, n° 2, pp. 185-192.

LEHMANN, A. T., BREWER, G. J., BOXLER, D. J., ZHU, J. J., HANFORD, K., TAYLOR, D., KENAR, J. A., CERMAK, S. C. et HOGSETTE, J. A., 2023. A push-pull strategy to suppress stable fly (Diptera: Muscidae) attacks on pasture cattle via a coconut oil fatty acid repellent formulation and traps with m-cresol lures. *Pest Management Science*. 2023. Vol. 79, n° 9, pp. 3050-3057. DOI 10.1002/ps.7480.

LIÉNARD, E., SALEM, A., JACQUIET, P., GRISEZ, C., PRÉVOT, F., BLANCHARD, B., BOUHSIRA, E. et FRANC, M., 2013. Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Parasitology Research*. 2013. Vol. 112, n° 2, pp. 479-486. DOI 10.1007/s00436-012-3157-6.

LINDH, J. M., GOSWAMI, P., BLACKBURN, R. S., ARNOLD, S. E. J., VALE, G. A., LEHANE, M. J. et TORR, S. J., 2012. Optimizing the Colour and Fabric of Targets for the Control of the Tsetse Fly *Glossina fuscipes fuscipes*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2012. Vol. 6, n° 5, pp. e1661. DOI 10.1371/journal.pntd.0001661.

LIU, S. S., LI, A. Y., LOHMEYER, K. H. et PÉREZ DE LEÓN, A. A., 2012. Effects of pyriproxyfen and buprofezin on immature development and reproduction in the stable fly *. *Medical and Veterinary Entomology*. 2012. Vol. 26, n° 4, pp. 379-385. DOI 10.1111/j.1365-2915.2012.01013.x.

MIHOK, S., 2002. The development of a multipurpose trap (the Nzi) for tsetse and other biting flies. *Bulletin of Entomological Research*. 2002. Vol. 92, n° 5, pp. 385-403. DOI 10.1079/BER2002186.

MIHOK, S., KANG'ETHE, E. K. et KAMAU, G. K., 1995. Trials of Traps and Attractants for *Stomoxys* spp. (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*. 1995. Vol. 32, n° 3, pp. 283-289. DOI 10.1093/jmedent/32.3.283.

MÜLLER, J., MANSER, V. et HEMPHILL, A., 2019. In vitro treatment of *Besnoitia besnoiti* with the naphtho-quinone buparvaquone results in marked inhibition of tachyzoite proliferation, mitochondrial alterations and rapid adaptation of tachyzoites to increased drug concentrations. *Parasitology*. 2019. Vol. 146, n° 1, pp. 112-120. DOI 10.1017/S0031182018000975.

MURCHIE, A., HALL, C., GORDON, A. et CLAWSON, S., 2018. Black Border Increases *Stomoxys calcitrans* Catch on White Sticky Traps. *Insects*. 2018. Vol. 9, n° 1, pp. 13. DOI 10.3390/insects9010013.

NAUEN, R., 2007. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science*. 2007. Vol. 63, n° 7, pp. 628-633. DOI 10.1002/ps.1406.

PICKENS, L.G., SCHMIDTMANN, E.T. et MILLER, R.W., 1994. How to control house and stable flies without using pesticides. janvier 1994. Vol. Agriculture Information Bulletin, n° 673.

PITZER, J. B., KAUFMAN, P. E. et TENBROECK, S. H., 2010. Assessing Permethrin

Resistance in the Stable Fly (Diptera: Muscidae) in Florida by Using Laboratory Selections and Field Evaluations. *Journal of Economic Entomology*. 2010. Vol. 103, n° 6, pp. 2258-2263. DOI 10.1603/EC10166.

REISSERT-OPPERMANN, S., BAUER, B., STEUBER, S. et CLAUSEN, P-H., 2019. Insecticide resistance in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) on dairy farms in Germany. *Parasitology Research*. 2019. Vol. 118, n° 9, pp. 2499-2507. DOI 10.1007/s00436-019-06400-z.

ROCHON, K, HOGSETTE, J A, KAUFMAN, P E, OLAFSON, P U, SWIGER, S L et TAYLOR, D B, 2021. Stable Fly (Diptera: Muscidae)—Biology, Management, and Research Needs. MESSENGER, Matthew (éd.), *Journal of Integrated Pest Management*. 2021. Vol. 12, n° 1, pp. 38. DOI 10.1093/jipm/pmab029.

SALEM, A., FRANC, M., JACQUIET, P., BOUHSIRA, E. et LIÉNARD, E., 2012. Feeding and breeding aspects of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) under laboratory conditions. *Parasite*. 2012. Vol. 19, n° 4, pp. 309-317. DOI 10.1051/parasite/2012194309.

SHAHID, A., ZAIDI, S., AKBAR, H. et SAEED, S., 2019. An investigation on some toxic effects of pyriproxyfen in adult male mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* [en ligne]. septembre 2019. Vol. 22, n° 9. DOI 10.22038/ijbms.2019.33825.8051. Disponible à l'adresse : <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.33825.8051>

SHARIF, S., JACQUIET, P., PREVOT, F., GRISEZ, C., RAYMOND-LETRON, I., SEMIN, M. O., GEFFRÉ, A., TRUMEL, C., FRANC, M., BOUHSIRA, É. et LIÉNARD, E., 2019. *Stomoxys calcitrans*, mechanical vector of virulent *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle to susceptible rabbit. *Medical and Veterinary Entomology*. 2019. Vol. 33, n° 2, pp. 247-255. DOI 10.1111/mve.12356.

SHARIF, S., JACQUIET, P., PRÉVOT, F., GRISEZ, C., BOUHSIRA, E., FRANC, M. et LIENARD, E., 2017. Assessment of persistence of *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) bradyzoites in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2017. Vol. 168, n° 7-9, pp. 197.

SHARIF, S., LIÉNARD, E., DUVALLET, G., ETIENNE, L., MONGELLAZ, C., GRISEZ, C., FRANC, M., BOUHSIRA, E. et JACQUIET, P., 2020. Attractiveness and Specificity of Different Polyethylene Blue Screens on *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Insects*. 2020. Vol. 11, n° 9, pp. 575. DOI 10.3390/insects11090575.

SWEENEY, C. R., SCANLON, T., RUSSELL, G. E., SMITH, G. et BOSTON, R. C., 2000. Effect of daily floor treatment with sodium bisulfate on the fly population of horse stalls. *American Journal of Veterinary Research*. 2000. Vol. 61, n° 8, pp. 910-913. DOI 10.2460/ajvr.2000.61.910.

TAINCHUM, K., SHUKRI, S., DUVALLET, G., ETIENNE, L. et JACQUIET, P., 2018. Phenotypic susceptibility to pyrethroids and organophosphate of wild *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) populations in southwestern France. *Parasitology Research*. 2018. Vol. 117, n° 12, pp. 4027-4032. DOI 10.1007/s00436-018-6109-y.

VANDERWAAL, K. L. et EZENWA, V. O., 2016. Heterogeneity in pathogen transmission: mechanisms and methodology. HAWLEY, Dana (éd.), *Functional Ecology*. 2016. Vol. 30, n° 10, pp. 1606-1622. DOI 10.1111/1365-2435.12645.

WARDHAUGH, K. G., 2005. Insecticidal activity of synthetic pyrethroids, organophosphates, insect growth regulators, and other livestock parasiticides: An Australian perspective. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2005. Vol. 24, n° 4, pp. 789-796. DOI 10.1897/03-588.1.

WHALON, M. E., MOTA-SANCHEZ, D. et HOLLINGWORTH, R. M., 2009. Global Pesticide Resistance in Arthropods. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2009. Vol. 131, n° 1, pp. 106-106. DOI 10.1111/j.1570-7458.2009.00828.x.

WOOD S., T., 1999. Ultra-Low Volume - an overview. In : *Pesticide Chemistry and Bioscience* [en ligne]. pp. 120-133. Disponible à l'adresse : <https://www-sciencedirect-com.gorgone.univ-toulouse.fr/topics/agricultural-and-biological-sciences/ultra-low-volume>

YERUHAM, I. et BRAVERMAN, Y., 1995. Skin lesions in dogs, horses and calves caused by the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Revue D'élevage Et De Medecine Veterinaire Des Pays Tropicaux*. 1995. Vol. 48, n° 4, pp. 347-349.

ZHOU, E., SILVA, L. M. R., CONEJEROS, I., VELÁSQUEZ, Z. D., HIRZ, M., GÄRTNER, U., JACQUIET, P., TAUBERT, A. et HERMOSILLA, C., 2020. *Besnoitia besnoiti* bradyzoite stages induce suicidal- and rapid vital-NETosis. *Parasitology*. 2020. Vol. 147, n° 4, pp. 401-409. DOI 10.1017/S0031182019001707.

Deuxième partie : Évaluation de nouveaux pièges à mouches hématophages par la méthode des carrés latins

1. Objectifs et contexte de l'étude

Cette étude s'inscrit dans la mise au point de nouveaux pièges à mouches hématophages, moins coûteux et présentant un impact moins important sur l'environnement au regard des pièges actuels. Ces nouveaux pièges ont vocation à être industrialisables, 100% biodégradables et économiquement abordables afin qu'ils puissent être facilement déployés sur le territoire Français mais également à l'étranger. Les trois prototypes de pièges utilisés ont été assemblés par le Dr. Desquesnes.

L'étude a pour objectif d'évaluer l'efficacité de ces nouveaux pièges en comparaison du piège Vavoua, très largement utilisé et considéré en l'état comme le piège de référence. Les données recueillies permettront aussi de comparer les nouveaux pièges entre eux. Deux critères seront utilisés pour évaluer l'efficacité : la sensibilité, définie par le nombre de stomoxes capturés par jour, et la spécificité, définie par la proportion de stomoxes capturés (nombre de stomoxes capturés / nombre total d'insectes capturés).

Les données ont été recueillies par Mariana Ribeiro Sato et ma contribution à cette étude a été de réaliser l'analyse des données.

2. Matériels et méthodes

2.1. Présentation des nouveaux pièges

Le piège de référence Vavoua est décrit dans la partie 1 (Figure 9). Le piège P23d+ (Figure 11 A) est un piège rectangulaire constitué de deux panneaux bleus et de deux panneaux noirs se recoupant perpendiculairement. Il est équipé d'une partie en tulle ne recouvrant que la partie supérieure du piège. Les modifications apportées sur les pièges P33 et P35 par rapport au modèle P23d+ sont l'ajout d'une forme trapézoïdale et un agrandissement des panneaux bleus (Figure 11 B-C). Le biseau amené par la forme trapézoïdale permet notamment de diminuer les forces de traction au niveau des coutures et donc d'améliorer la résistance des pièges. Le modèle P35 dispose de 4 panneaux noirs alors que les modèles P23d+ et P33 n'en ont que 2.

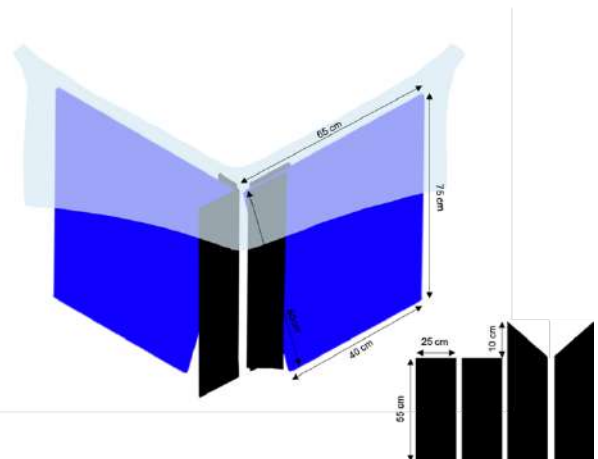
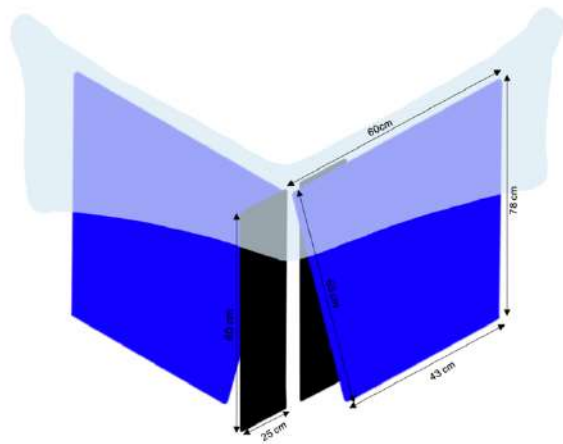
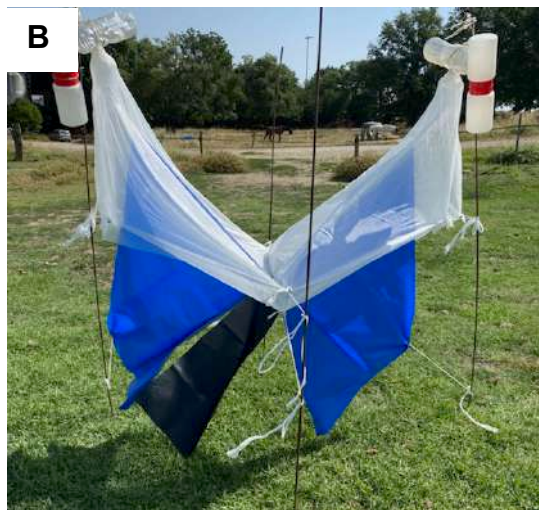
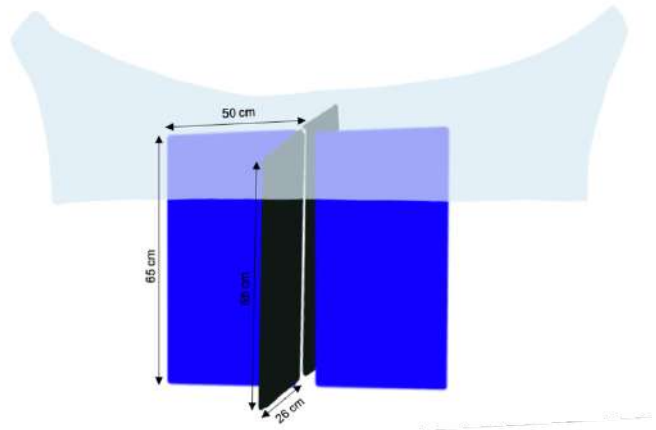


Figure 11 : Photographies et schémas des pièges P23d+ (A), P33 (B) et P35 (C)

Les pièges sont tous munis d'un dispositif de conservation (Figure 12) afin de capturer et de conserver les insectes. Ces dispositifs sont constitués d'une bouteille en plastique et de deux flacons apposés grâce à de la colle. Le flacon inférieur contient de l'alcool afin de permettre la conservation des insectes jusqu'à l'étape d'identification et de dénombrement.



Figure 12 : Photographie d'un dispositif de capture et conservation des insectes

2.1. Conditions expérimentales

2.1.1. Disposition des pièges sur sites

L'expérience s'est déroulée au sein du centre équestre de l'ENVT. Les 4 sites, identifiés dans des travaux préalables (Miquel 2023) ont été positionnés au niveau des prés à chevaux, dont l'un est mitoyen d'un élevage de bovins laitiers (Figure 13). Ces sites ont été déterminés pour être à une distance suffisante et à peu près égale les uns des autres pour éviter une compétition entre les pièges.



Figure 13 : Présentation de la répartition des sites d'expérience du carré latin au sein du Centre Équestre de l'ENVT (capture d'écran Google Maps 06/04/2024)

2.1.2. Organisation de l'expérience par la méthode des carrés latins

La méthode des carrés latins permet d'organiser une expérience de manière à minimiser l'impact dû à des variables expérimentales. Il s'agit de structurer l'expérience de manière à ce que le nombre de « traitements » soit égal au nombre de « répétitions » (Mason, Gunst, Hess 2003).

Dans le cadre de notre expérience, les carrés latins permettent de minimiser les variables météorologiques et positionnelles. Les 4 pièges (numérotés de 1 à 4) ont été disposés sur 4 sites (cf les 4 colonnes du Tableau 1) sur lesquels ils sont installés chacun à leur tour. Un cycle constitue le passage de chaque piège sur chacun des sites et est donc complet au bout de 4 rotations, comme représenté dans le Tableau 1. On appelle ce cycle une « réplication ».

Tableau 1 : Représentation d'un cycle entier, ou réplication, d'un carré latin d'ordre 4

Rotation 1	1	2	3	4
Rotation 2	2	3	4	1
Rotation 3	3	4	1	2
Rotation 4	4	1	2	3

Les rotations ont toujours été effectuées dans le sens des aiguilles d'une montre et dans le sens inverse de la numérotation des sites. A la fin de chaque rotation, les insectes capturés ont été comptabilisés et identifiés.

2.3. Analyses statistiques

Pour chaque piège, la spécificité et la sensibilité ont été analysés par rapport à notre piège de référence, le piège « Vavoua ».

L'analyse statistique et la présentation graphique ont été réalisées à partir du logiciel R et RStudio. Un test de Wilcoxon a été réalisé entre chaque piège expérimental et le piège de référence après un test de la normalité grâce au test de Shapiro-Wilk. L'ensemble des données ne remplit pas les conditions de normalité. Le test statistique pour évaluer la significativité des différences entre pièges a donc été un test de Wilcoxon.

Les résultats ont ensuite été représentés sous forme de boîte à moustache avec affichage des niveaux de significativité associés à chaque test : ns (non significatif) = $p > 0,05$; * = $0,05 < p < 0,01$; ** = $0,01 < p < 0,001$; *** = $p < 0,001$.

3. Résultats

L'expérience a eu lieu entre le 30/05/2024 et le 28/06/2024. Un total de 12 rotations a été effectué pour un ensemble de 3 réplifications de cycle complet. Les rotations ont duré entre 1 et 2 jours en fonction des conditions météorologiques et donc de la densité de stomoxes présente afin d'avoir une capture suffisante d'insectes. Lors de cette expérience un total de 14.516 stomoxes a été capturé.

3.1. Sensibilité des pièges évalués

La réalisation d'un test de Shapiro-Wilk a été effectuée à partir des données « nombre de stomoxes capturés par jour » pour chacun des pièges. Les « p-values » associées sont respectivement de 0,0046, 0,0009, 0,0005 et 0,0039 pour les pièges « Vavoua », P23d+, P33 et P35. Ces valeurs sont toutes inférieures au seuil fixé de 0,05. Les conditions de normalité ne sont donc pas respectées et un test de Wilcoxon a été appliqué pour la comparaison de chaque piège expérimental avec le Vavoua, et celle de chaque piège entre eux. Les résultats sont présentés dans la Figure 14.

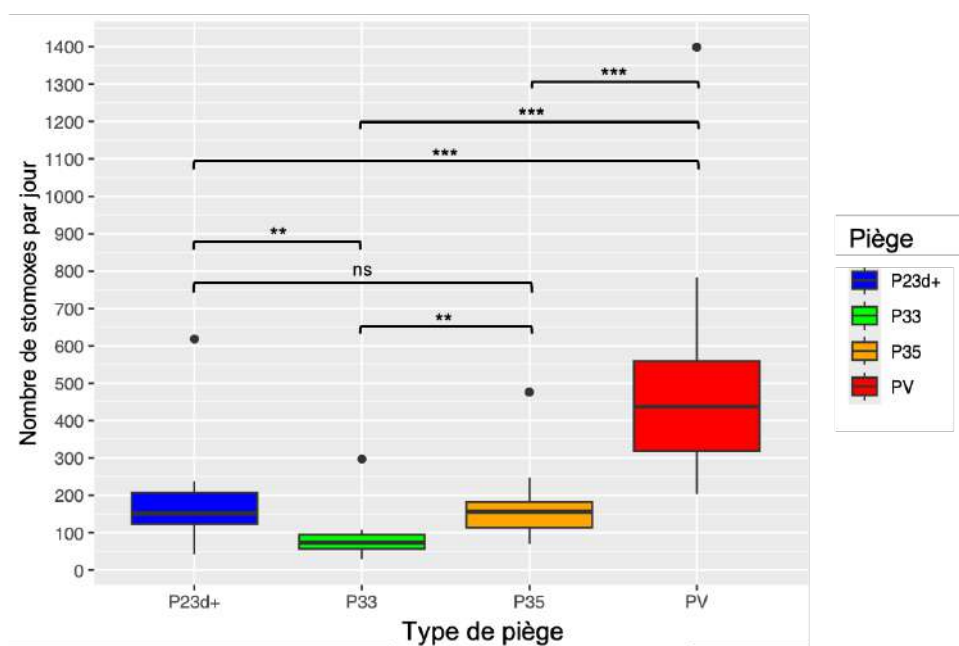


Figure 14 : Comparaison de la sensibilité des pièges évalués : boîtes à moustache représentant la distribution des effectifs de stomoxes capturés par jour pour les pièges P23d+, P33, P35 et « Vavoua », et leur signification statistique.

Les médianes de sensibilité pour les pièges « Vavoua », P35, P23d+, et P33 sont respectivement de 437, 156, 151 et 73 stomoxes/jour. Toutes les valeurs maximales des pièges ont été atteintes le 23/06/2024 avec des valeurs à 1399, 476, 618 et 297 et stomoxes/jour, respectivement pour les pièges « Vavoua », P35, P23d+ et P33. Pour les trois pièges expérimentaux (P23d+ ; P33 ; P35), la sensibilité est statistiquement différente de celle du piège Vavoua. Nous pouvons donc conclure que les 3 pièges expérimentaux sont moins sensibles que le piège de référence Vavoua. Les pièges P23d+ et P35 ont une sensibilité similaire et significativement supérieure à celle du piège P33.

3.2. Spécificité des pièges évalués

La réalisation d'un test de Shapiro-Wilk a été effectuée à partir des données « nombre de stomoxes capturés sur l'ensemble des insectes capturés » pour chacun des pièges. Les « p-values » associées à ce test sont de 0,02, 0,003, 0,01 et 0,002 pour les pièges Vavoua, P23d+, P33 et P35. Ces valeurs sont toutes inférieures au seuil de 0,05 fixé. Les conditions de normalité ne sont donc pas respectées et un test de Wilcoxon a été appliqué pour la comparaison de chaque piège expérimental avec le Vavoua et celle de chaque piège entre eux. Les résultats sont présentés dans la Figure 15.

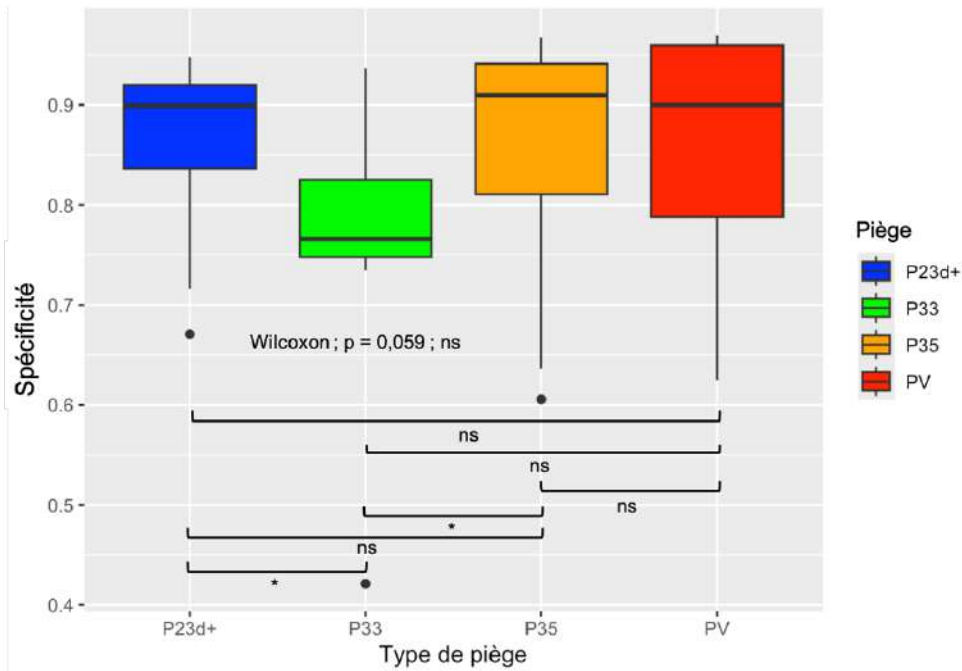


Figure 15 : Comparaison de la spécificité des pièges évalués : boîtes à moustache représentant la proportion de stomoxes capturés par jour pour les pièges P23d+, P33, P35 et « Vavoua », et leur signification statistique.

Pour les trois pièges expérimentaux (P23d+ ; P33 ; P35), il n'y a pas différence statistiquement significative de spécificité avec le piège Vavoua. Nous pouvons donc conclure que nos pièges expérimentaux ont une spécificité équivalente à celle du piège de référence Vavoua. Il n'y a également pas de différence significative de spécificité entre le piège P23d+ et P35. Toutefois, les pièges P23d+ et P35 possèdent une spécificité significativement supérieure au prototype P33.

4. Discussion

Les performances du piège P33 en termes de sensibilité et de spécificité sont moins bonnes que celles des pièges P23d+ et P35 qui ont tous les deux des performances similaires. La présence des 2 panneaux noirs supplémentaires sur le modèle P35 pourrait donc corriger la baisse de sensibilité apportée par les modifications communes du P33 et P35. Finalement, l'accroissement de la surface de film bleu ne semble pas apporter de gain d'efficacité.

Les modèles P23d+ et P35 ont des performances similaires mais l'agrandissement des panneaux et l'ajout de la forme trapézoïdale rendent le modèle P35 plus coûteux

à fabriquer (plus de matériaux et plus de complexité des coupes à réaliser). Il est alors plus judicieux de favoriser le modèle P23d+ par rapport au P35.

Les fortes spécificités des pièges observées dans cette étude sont à nuancer du fait de la faible diversité des espèces présentes sur le site du centre équestre de l'ENVT. Il est néanmoins intéressant de signaler que les spécificités de ces pièges ne sont pas statistiquement différentes de celles du piège « Vavoua » de référence. La médiane de spécificité du piège P33 est toutefois bien inférieure à celle des pièges P23d+, P35 et « Vavoua ».

4. Conclusion

Cette expérience permet de mettre en évidence une efficacité de capture et une spécificité plus importante des modèles P23d+ et P35 par comparaison au modèle P33. Ces performances sont à comparer avec celles du piège « Vavoua » de référence qui restent néanmoins bien meilleures en termes de sensibilité.

Les prochaines modifications à apporter aux pièges expérimentaux devront donc avoir pour objectif d'améliorer encore grandement la sensibilité sans en diminuer la spécificité. Il serait intéressant de tester un modèle basé sur le modèle P23d+ avec un apport de 2 panneaux noirs supplémentaires, afin de tenter de reproduire les augmentations de la sensibilité et de la spécificité qui ont été observées sur le modèle P35 par comparaison au modèle P33.

Références bibliographiques

MASON, R. L., GUNST, R. F. et HESS, J. L., 2003. *Statistical Design and Analysis of Experiments: With Applications to Engineering and Science*. John Wiley & Sons. ISBN 978-0-471-45851-7.

MIQUEL, L., 2023. *Développement de nouveaux pièges pour la lutte contre les mouches hématophages*. Thèse d'exercice Médecine vétérinaire. Université Toulouse 3 Paul Sabatier.

Troisième partie : Surveillance de la population de stomoxes dans 5 élevages du Gers

1. Objectif et contexte de l'étude

La phénologie des stomoxes dans la région a été étudiée sur le site de l'école nationale vétérinaire de Toulouse au cours de l'année 2009 (Rouet 2011). Il a alors été observé une dynamique biphasique (Figure 16) des stomoxes qui peut être corrélée à la température et à l'humidité, notamment celle du sol où se développent les larves, avec une phase de forte densité lors des mois de juin et juillet (température de 25 à 27°C et humidité relative entre 35 et 70%), suivie d'une baisse au cours du mois d'août lorsque les températures sont très élevées (> 27°C), et à la suite d'une longue période sans précipitations avec une humidité relative basse (< 40%). Un second pic de densité est constaté au cours du mois de novembre suite à une brève augmentation des températures et la reprise des précipitations qui rendent le milieu à nouveau favorable au développement larvaire. Ce second pic correspond également à l'émergence d'adultes issus des pontes des générations qui se sont développées lors du premier pic. Cette étude conclue également à l'absence de stomoxes pour des valeurs inférieures à 15°C (Rouet 2011).

Ces observations méritent d'être confortées par une étude sur d'autres sites et sur une échelle de temps plus importante.

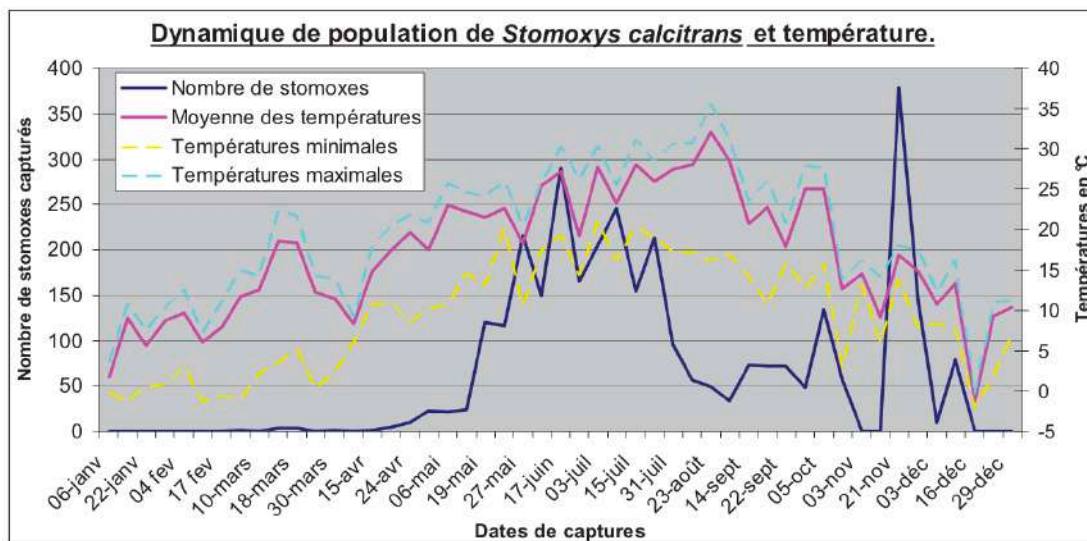


Figure 16 : Dynamique de population de *Stomoxys calcitrans* et courbes de températures en (maximales, minimales et moyennes) au cours de l'année 2009 et d'après (Rouet 2011) sur le site de l'ENVT.

L'objectif premier de cette étude est d'évaluer sur une période longue (3 années) et sur plusieurs zones (5 élevages) la dynamique des populations de stomoxes (Figure 17). Ceci a été réalisé dans le département du Gers par la collecte de données entre mai 2021 et septembre 2024 grâce à la mise en place de dispositifs de capture permanents, à savoir des pièges Vavoua, munis de dispositifs de conservation nécessaires à l'identification et au dénombrement ultérieurs. Cette étude repose sur l'hypothèse que les captures reflètent le niveau d'abondance des mouches hématophages.



Figure 17 : Cartographie des 5 élevages étudiés dans le Gers (capture d'écran du 07 juillet 2024)

Le second objectif est de mesurer l'impact sur l'abondance des populations de stomoxes de la mise en place de pièges dans certains de ces élevages. Dans cette expérience, coexistent sur un élevage deux types de pièges : i) les pièges Vavoua avec dispositif de conservation que l'on qualifiera de pièges de « mesure » ; ii) des pièges expérimentaux, prototypes en développement dont on souhaite évaluer l'impact, que l'on qualifiera de pièges de « lutte ». Les pièges de lutte ne sont en général pas munis de dispositif de conservation pour dénombrement, et sont en nombre important par rapport aux pièges de mesure. L'influence de leur présence sur l'élevage sera appréciée par une diminution potentielle des captures dans les pièges de « mesure ». L'étude de l'impact de la mise en place de pièges sur l'abondance des populations de stomoxes a été réalisée sur 3 élevages, celui de Castelnaud d'Arbieu, celui de Homps et celui d'Escorneboeuf. Ces trois élevages ont été sélectionnés pour la présence de nuisances par les stomoxes signalées par les éleveurs, associée à une

absence d'utilisation d'insecticides, avec une gestion raisonnée des effluents et un périmètre réduit de parcours des bovins autour des étables (Miquel 2023).

2. Matériels et Méthodes

2.1. Description des pièges utilisés

Les pièges de « mesure » sont des pièges Vavoua (cf Figure 9, Partie 1). Ceux-ci possèdent des dispositifs de conservation (cf Figure 12, Partie 2). Quatre types de pièges de « lutte » ont été utilisés : prototypes « P2 » et « P4 », prototype « P10 » et prototype « P23 ». Les prototypes « P2 » et « P4 » (Figure 18 A-B) sont des pièges trapézoïdaux avec un sommet conique et une ouverture surmontée d'un panneau bleu. Le piège « P4 » se différencie du « P2 » par une ouverture de taille plus importante. Le prototype « P10 » (Figure 18 C) est un piège rectangulaire muni d'un panneau bleu central et de deux ouvertures se faisant face. Le prototype « P23 » (Figure 18 D) est proche du modèle P23d+ étudié dans la Partie 2 avec une moustiquaire présente seulement sur la partie haute du piège et quatre panneaux, deux bleus et deux noirs.

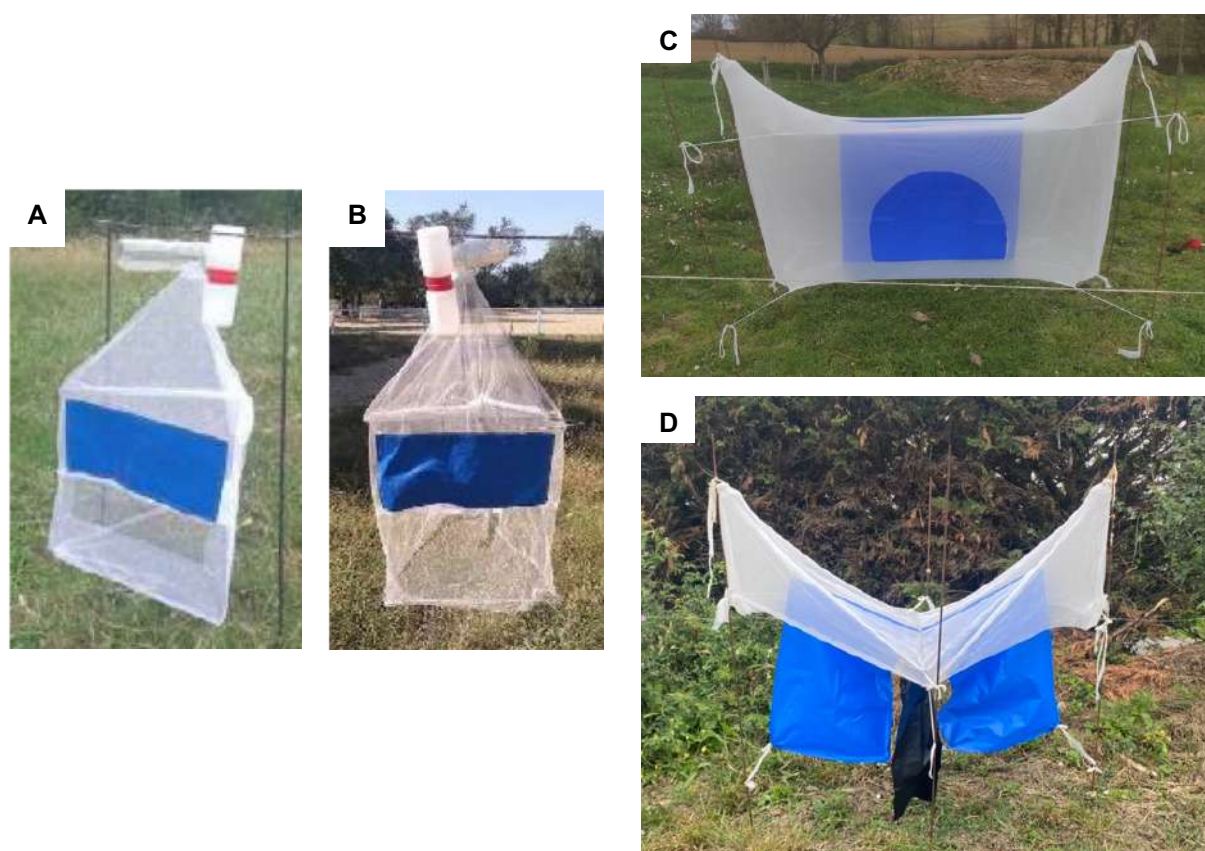


Figure 18 : Prototypes de pièges expérimentaux : (A) Prototype de piège « P2 » (photographie de L. Miquel) (B) Prototype de piège « P4 » (photographie de L. Miquel), (C) Prototype de piège « P10 » (photographie originale de M. Desquesnes) (D) Prototype de piège « P23 »

2.2. Collecte des données

La surveillance de la population de stomoxes pour chacun des 2 objectifs de l'étude a été réalisée par le comptage d'insectes capturés dans chacun des pièges de « mesure » installés en permanence dans chacun des 5 élevages. Tous les pièges sont relevés lors d'une même tournée. Les tournées ont été espacées d'une semaine en périodes de forte densité (période estivale) et jusqu'à quatre semaines en périodes de faible densité (période hivernale). Le rapprochement des tournées en période estivale est justifié par la saturation des flacons d'alcool et/ou leur évaporation. En effet, à partir d'une certaine quantité de stomoxes, la proportion d'alcool devient insuffisante pour permettre une bonne conservation. Une fois les flacons collectés, les insectes ont été identifiés puis dénombrés.

2.3. Présentation des élevages

Les caractéristiques générales des élevages sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 2). Chaque élevage est désigné par la commune où il est installé.

Tableau 2 : Présentation des caractéristiques générales des 5 élevages sites de l'étude

	Aubiet	Marsan	Castelnaud d'Arbieu	Homps	Escorneboeuf
Date de création / reprise	<i>Donnée non disponible</i>	1992	1993	2007	<i>Donnée non disponible</i>
Type de production	Allaitant	Allaitant	Laitier	Allaitant	Allaitant
Race(s)	Blonde d'Aquitaine	Blonde d'Aquitaine	Prim'Holstein principalement (autres races : montbéliarde, normande et simmental)	Blonde d'Aquitaine	Blonde d'Aquitaine
Nombre de mère	100	85	60 (mère en lactation)	50	50
Reproduction (IA/Monte naturelle)	<i>Donnée non disponible</i>	70% Monte naturelle / 30% IA	Monte naturelle	Monte naturelle	<i>Donnée non disponible</i>
Parcours extérieur	Oui				
SAU (hectares)	120	158	230	130	93
UMO (personnes)	<i>Donnée non disponible</i>	1,5	3	2	<i>Donnée non disponible</i>

2.4. Déploiement des pièges dans les cinq élevages

Le nombre de pièges présents et leur localisation a parfois évolué au fil des années. Une synthèse du nombre de pièges installés est présentée dans la Figure 19. Deux à cinq pièges de « mesure » ont été présents sur chacun des cinq sites de l'étude. La logique de déploiement a été d'explorer les densités de mouches dans l'ensemble de l'élevage. Les sites d'Aubiet et de Marsan accueillent uniquement des pièges de « mesure ». L'absence de piège de « lutte » sur ces sites fait qu'ils sont aussi considérés comme des sites « contrôles » pour évaluer l'impact de l'introduction de piège de « lutte ». C'est le second objectif de l'étude, effectué sur les sites de Castelnau d'Arbieu, Homps, et Escorneboeuf.

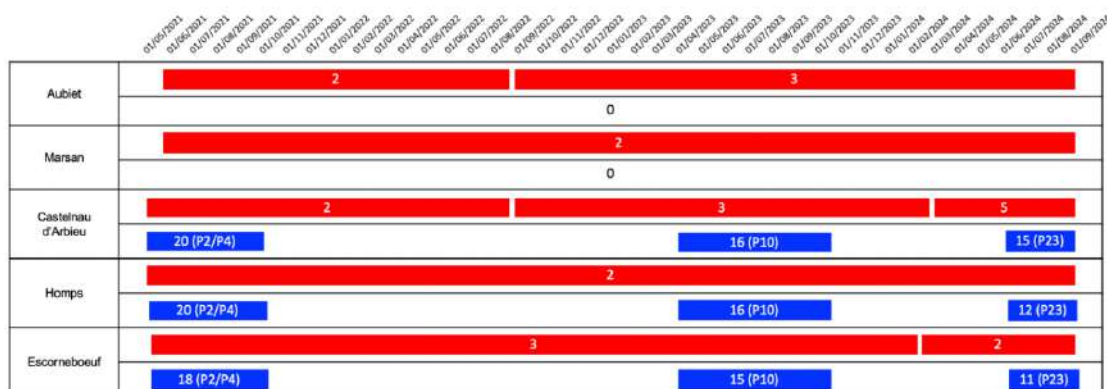


Figure 19 : Frise chronologique indiquant la présence de pièges dans les différents élevages. En rouge sont représentés les pièges « Vavoua » et en bleu les pièges expérimentaux.

L'installation des pièges de « lutte » a été temporaire, et s'est étendue sur trois périodes : la première, de mai 2021 à octobre 2021, correspond au déploiement des pièges de type P2 et P4 ; la seconde, d'avril 2023 à octobre 2023, au déploiement de pièges de type P10 ; et la troisième, de juin à début septembre 2024, au déploiement des pièges P23. La disposition topologique actuelle des pièges sur chacun des élevages est illustrée dans la Figure 20. La logique de déploiement a été de distribuer les pièges de manière homogène, proches des parcelles les plus fréquentées par le bétail (étables, bâtiments d'élevage, pâture principale) et proches des sites de développement larvaire des stomoxes.

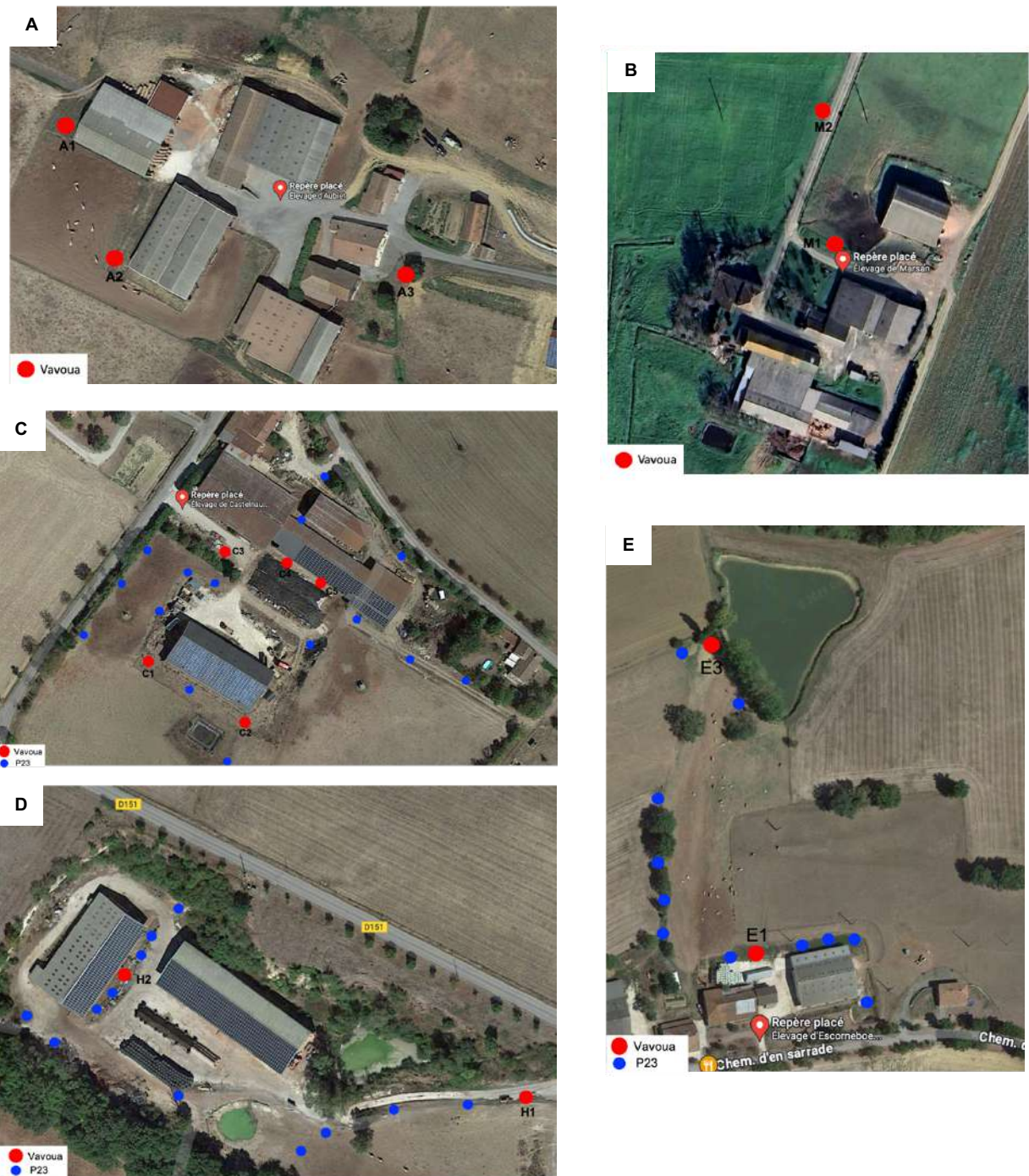


Figure 20 : Dispositions des pièges dans les cinq élevages (A) Aubiet (B) Marsan (C) Castelnaud d'Arbieu (D) Homps (E) Escorneboeuf (Capture d'écran de Google Maps du 20/03/2024)

3. Résultats

3.1. Étude phénologique des stomoxes sur cinq élevages du Gers

La phénologie des populations de stomoxes a été étudiée sur trois années. Les données recueillies ont été agrégées en graphique à l'aide du logiciel Excel à partir de la moyenne de stomoxes capturés par piège et par jour, à laquelle on se référera

comme la « densité apparente moyenne ». Chaque point représente les données d'une tournée. Du fait de l'absence de données entre novembre 2021 et avril 2022 due à un manque de disponibilité et de ressources financières, aucun point n'est représenté sur cette période et celle-ci est représentée par une ligne droite fictive en pointillés.

Pour simplifier la lecture des graphiques, la période estivale, entre le 21 juin et le 21 septembre de chaque année, a été indiquée par une bande colorée orangée. Les périodes avec présence de pièges de « lutte » expérimentaux sont identifiées par un marquage en damier rouge (Figures 21 et 22).

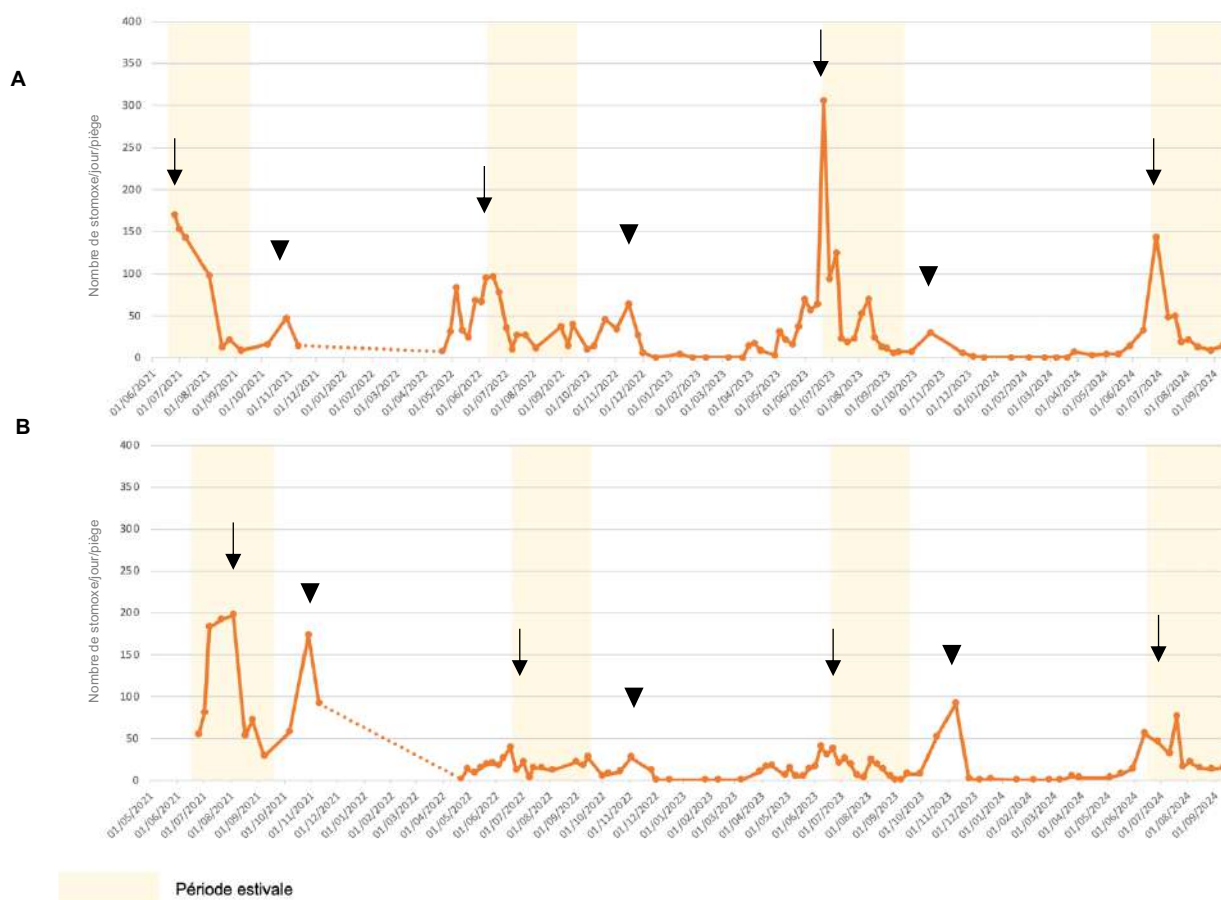


Figure 21 : Densité apparente moyenne de stomoxe par piège « Vavoua » et par jour entre le 25/06/2021 et le 10/09/2024 dans les élevages d'Aubiet (A) et de Marsan (B).

Légende : Périodes estivales indiquées sur fond orangé ; pics d'abondance estivaux des stomoxes indiqués par des flèche et pics automnaux indiqués par des têtes de flèche

Dans l'élevage d'Aubiet, on observe une première phase de forte présence de stomoxes entre avril et juillet (flèche Figure 21A) avec un pic souvent atteint au mois de juillet. Une seconde phase de forte présence, néanmoins plus faible, est observable lors des mois d'octobre et novembre. Cette dynamique est reproductible sur les trois années de l'étude, avec des variations des intensités des pics estivaux (flèches) et

automnaux (têtes de flèche). Ces variations saisonnières sont également visibles dans l'élevage de Marsan avec un pic automnal plus marqué, lequel est en 2023 plus important que le pic estival. Les différences interannuelles entre ces deux élevages sont relativement faibles, à l'exception de l'année 2023 où un pic d'abondance estival très élevé n'est observé que dans l'élevage de Marsan. On observe également de faibles pics de densité de mouches au cours de l'été 2022 (sécheresse).

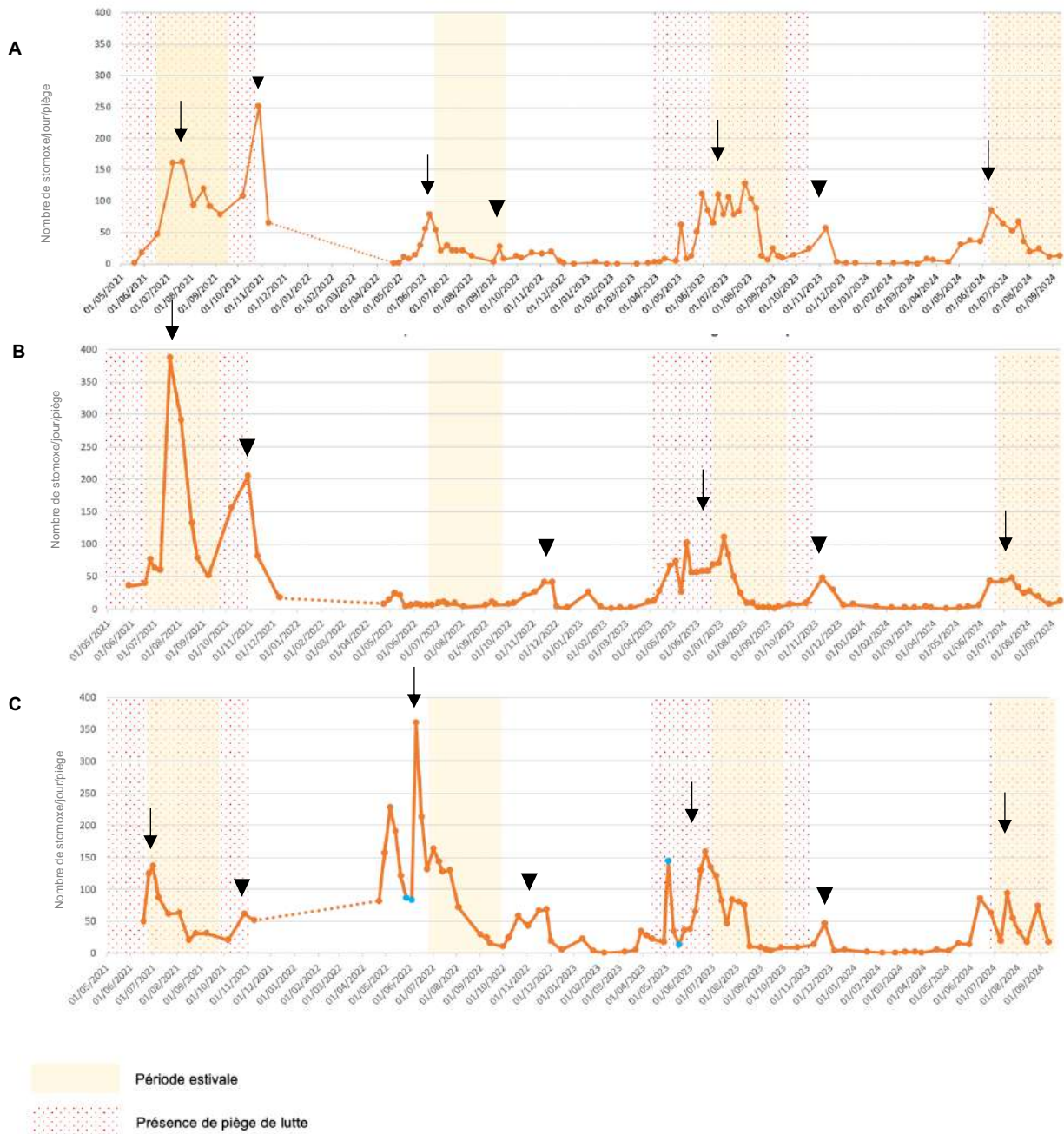


Figure 22 : Densité apparente moyenne de stomoxe par piège « Vavoua » et par jour entre le 19/05/2021 et le 10/09/2024 dans les élevages de Castelnau d'Arbieu (A), de Homps (B) et d'Escomeboeuf (C).

Légende : Périodes estivales indiquées sur fond orangé ; périodes de lutte avec prototypes de pièges sur fond de damier rouge ; pics d'abondance estivaux des stomoxes indiqués par des flèche et pics automnaux indiqués par des têtes de flèche ; les points en bleus (*) représentent des densités moyennes obtenues en l'absence d'un des pièges de l'élevage menant à de possibles écarts à la tendance observée.

Sur les sites de Castelnau d'Arbieu, de Homps et d'Escorneboeuf, l'analyse de la phénologie des stomoxes est plus délicate, puisque ces trois sites accueillent en plus des pièges de « mesure » des pièges de « lutte » ; une dilution des captures des pièges « Vavoua » pourrait donc être induite par la présence des pièges de lutte, toutefois, les pièges « Vavoua » ont été implantés sur des sites considérés comme les plus favorables à la capture des stomoxes afin d'éviter cet écueil. On remarquera cependant que cette même dynamique, avec deux pics, l'un estival et l'autre automnal, est également observée (Figure 22) avec ou sans lutte. Le second pic est toujours plus faible que le premier, à l'exception de celui d'octobre 2021 à Castelnau d'Arbieu, où il atteint 251 stomoxes/piège/jour dépassant ainsi celui de début juillet 2021 qui est de 160 stomoxes/piège/jours. En 2022, il est à noter une baisse importante de densité des mouches hématophages dans les élevages de Castelnau d'Arbieu et de Homps (à l'instar des élevages contrôle présentés Figure 20), qui n'est pas retrouvée à Escorneboeuf où la densité est même supérieure aux autres années (Figure 22C).

Dans l'ensemble, en 2021, tous les élevages présentent des pics comparables à l'exception de celui de Homps, particulièrement élevé ; la sécheresse de l'été 2022 explique la faible intensité des pics d'abondance dans tous les élevages à l'exception de celui d'Escorneboeuf qui présente un pic estival exceptionnel; en 2023, tous les élevages présentent des densités moyennes voisines à l'exception de celui d'Aubiet qui présente un pic estival exceptionnel; enfin en 2024 les dynamiques sont assez voisines dans tous les élevages.

On peut donc conclure que la présence de stomoxes sur les élevages étudiés répond globalement à un rythme annuel, avec deux pics, le premier estival, le second automnal, mais qu'à cette caractéristique s'ajoutent des traits particuliers, propres à chaque élevage, reflétant des spécificités de sites dont les conséquences induisent des pics de densités parfois contraires aux tendances générales.

3.2. Impact de la mise en place des pièges de « lutte » sur la présence de stomoxes

L'évaluation de l'impact des pièges de « lutte » sur la dynamique de population des stomoxes requière une « situation de référence », point de comparaison dans l'analyse. Les sites de Aubiet et de Marsan qui disposent exclusivement de pièges de

« mesure » devaient servir de situation de référence. En pratique plusieurs difficultés sont apparues.

Les dynamiques interannuelles entre les deux élevages de référence ne sont pas les mêmes, celui de Marsan n'ayant pas eu une augmentation de densité significative entre 2022 et 2023, contrairement à celui d'Aubiet. De plus, l'intensité du pic automnal diffère entre les deux élevages : sur le site de Marsan celui-ci est plus intense que le pic estival, alors que sur le site d'Aubiet il est inférieur. Il est donc difficile d'établir un profil de référence auquel comparer la dynamique des stomoxes après la mise en place de piège de « lutte » dans les trois autres élevages.

D'autre part, la seule année où les pièges de « lutte » n'ont pas été déployés autour de la période estivale (ce qui aurait donc pu servir de référence), on observe dans deux des élevages tests (Castelnau d'Arbieu et Homps) des densités plus faibles voire une absence d'augmentation lors de la période attendue, entre mai et juillet. Cette dynamique est contraire aux attendus mais elle est une conséquence de la période de sécheresse subie en 2022. L'étude comparative de l'impact de la pose de pièges de « lutte » ne peut donc pas être conclusive. De manière grossière (non quantitative), on peut cependant proposer que la pose des pièges de « lutte » n'ait pas eu un impact majeur, puisque la dynamique biphasique de stomoxes a été observée dans les élevages avec ou sans pièges de « lutte ». Toutefois, l'installation des prototypes P10 (en 2023) pourrait avoir écrêté les pics d'abondance dans les 3 élevages traités puisque les pics de 2023 sont tous inférieurs aux pics observés les 2 années précédentes, contrairement à ce qui est observé dans un élevage contrôle (Aubiet). Dans tous les cas, l'intensité des pics d'abondance semble être une valeur très peu prédictible au vu des observations faites pendant près de 4 années dans ces 5 élevages avec ou sans lutte.

3. Discussion

Globalement, la dynamique de population des stomoxes dans les cinq élevages du Gers a été conforme à celle déjà observée par l'étude conduite sur le site de l'ENVT, avec une allure biphasique sur les périodes avril-juillet et octobre-novembre (Rouet 2011). Ceci avait également été observé en Amérique du Nord (Taylor, Berkebile, Scholl 2007) et dans les Pyrénées (Liénard et al. 2011). Néanmoins des variabilités

interannuelles importantes sont observées, la densité de stomoxes étant dépendante des conditions climatiques, plus particulièrement du couple température-pluviométrie. Il a été montré qu'une humidité relative faible, reliée à une pluviométrie faible, associée à des températures trop élevées est défavorable aux stomoxes (Taylor, Berkebile, Scholl 2007 ; Rouet 2011).

Afin d'intégrer les variables de température et d'humidité/pluviométrie à notre étude, les données météorologiques (température et pluviométrie) de la station de Mauroux (dpt 32) proche des élevages sites de l'étude, ont été intégrées aux graphes représentant la densité apparente moyenne de stomoxe sur les élevages (Figure 23). Cela a été réalisé uniquement pour les élevages de Aubiet et Marsan, pour s'affranchir d'une potentielle influence des pièges de « lutte » présents sur les trois autres élevages.

De manière générale, on observe que les périodes de forte densité estivale (pic estival) s'inscrivent dans les périodes de pics de température. Le pic automnal suit la baisse des températures estivales et correspond également à une augmentation de la pluviométrie pour les années 2022 et 2023. Ces observations confortent les conclusions de l'étude de Rouet, 2011. En revanche, l'absence de stomoxes pour des températures inférieures à 15°C n'est pas observée.

Au cours de l'année 2022, une absence d'augmentation de la densité apparente des stomoxes a été observée dans l'élevage de Homps, ainsi que des valeurs moyennes légèrement inférieures par rapport aux autres années dans les élevages de Castelnau d'Arbieu, d'Aubiet et de Marsan. Cette année-là, des températures élevées plus précoces ainsi qu'une pluviométrie plus basse explique les diminutions de populations de stomoxes.

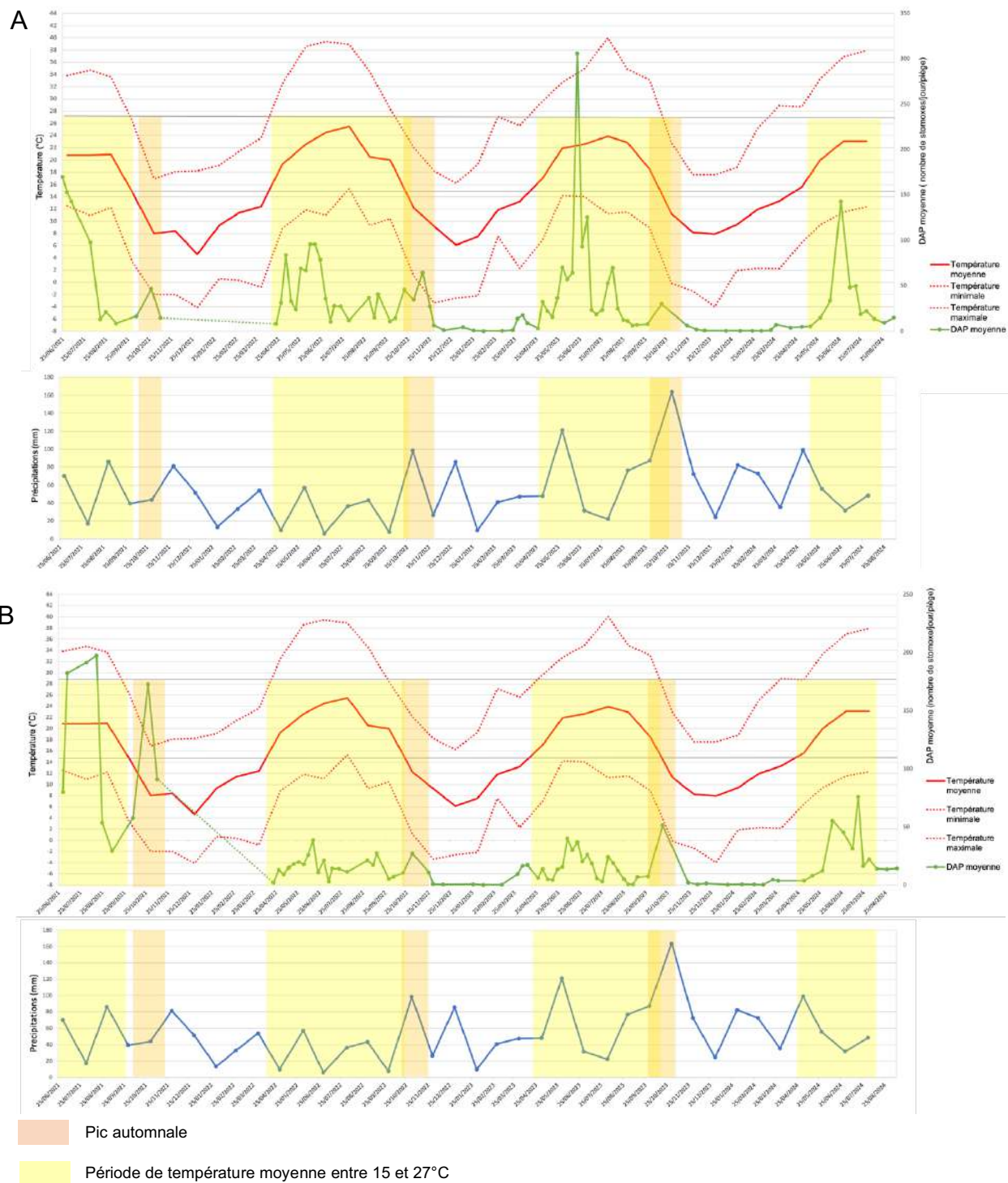


Figure 23 : Variations des températures et de la pluviométrie au cours des années 2021 à 2024 associées aux dynamiques de population de stomoxes observées dans les élevages de Aubiet (A) et Marsan (B). Données de la station météorologiques de Mauroux (dpt 32) (Source : infoclimat.fr, consulté le 10/09/2024) situé à 11 km de Homps et de Castelnau d'Arbieu, et à 29 km de Escorneboeuf, Marsan et Aubiet (source : infoclimat.fr, consulté le 08/07/2024)

La chute de densité de stomoxes de mai à juillet 2022 est à nuancer dans l'élevage de Marsan puisqu'une baisse similaire est également observée en avril-juillet 2023, contrairement aux autres élevages. L'élevage d'Escorneboeuf, lui, échappe à

cette tendance. Cela pourrait être expliqué par la présence d'un gîte larvaire important ou par la présence d'un point d'eau en bas de la pâture permettant de maintenir une humidité relative plus importante.

4. Conclusion

Cette étude rétrospective sur plus de 3 années de données de capture de pièges « Vavoua » dans 5 élevages du Gers permet de confirmer une périodicité annuelle bi-phasique des populations de stomoxes. Une première émergence précède la période estivale lorsque les températures commencent à augmenter, et une seconde apparaît suite au redoux de l'automne. Il est également important de souligner l'existence de variations interannuelles importantes, liées aux variations des conditions climatiques et à l'existence de paramètres site spécifiques, comme cela a été discuté pour l'élevage d'Escorneboeuf.

Les résultats de cette étude ne permettent pas de conclure sur l'impact des pièges de « lutte » dans les élevages de Castelnau d'Arbieu, de Homps, et d'Escorneboeuf, faute de pouvoir définir un référentiel de comparaison à partir des données recueillies sur les sites de Aubiet et de Marsan. Ceci résulte des variations interannuelles et inter-élevages observées. Afin de surmonter cette difficulté, une stratégie pourrait consister à étudier sur une période longue (plusieurs années) la dynamique des populations de stomoxes sur un même site, en y alternant sur de courtes durées (tous les 15 jours par exemple) la présence et l'absence de pièges de « lutte ». Une variation de la densité apparente de stomoxes corrélée au rythme des alternances serait un argument en faveur de leur efficacité dans la lutte contre les stomoxes, toutefois, les effets liés à la durée relative de développement larvaire pourraient interférer de manière déterminante dans un tel protocole.

Références bibliographiques

LIÉNARD, E., SALEM, A., GRISEZ, C., PRÉVOT, F., BERGEAUD, J. P., FRANC, M., GOTTSTEIN, B., ALZIEU, J. P., LAGALISSE, Y. et JACQUIET, P., 2011. A longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a dairy cattle farm of southwest France. *Veterinary Parasitology*. 2011. Vol. 177, n° 1-2, pp. 20-27. DOI 10.1016/j.vetpar.2010.11.030.

ROUET, D., 2011. *Dynamique des populations de Stomoxys calcitrans dans un site urbain, l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse*. Thèse d'exercice Médecine vétérinaire. ENVT : Paul Sabatier. Disponible à l'adresse : <https://oatao.univ-toulouse.fr/4970/2011> – TOU 3 – 4034

TAYLOR, D. B, BERKEBILE, D. R et SCHOLL, P. J, 2007. Stable Fly Population Dynamics in Eastern Nebraska in Relation to Climatic Variables. *Journal of Medical Entomology*. 2007. Vol. 44, n° 5, pp 765-771. DOI 10.1093/jmedent/44.5.765

Quatrième partie : Étude de la propagation du pathogène *Besnoitia besnoiti* par les stomoxes à l'aide de lignes de pièges à mouches hématophages

L'étude réalisée dans cette quatrième partie a vocation à servir de base pour une publication dans un journal scientifique. La rédaction de cette quatrième partie, qui constitue un bloc indépendant, peut en conséquence parfois, notamment dans l'introduction, répéter des éléments présents dans les autres parties de ce mémoire de thèse.

Introduction

La besnoitiose bovine est une maladie parasitaire grave affectant le bétail, causée par le protozoaire *Besnoitia besnoiti* (Apicomplexa : Sarcocystidae). Ce parasite intracellulaire se développe d'abord sous forme de tachyzoïtes dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, puis sous forme de bradyzoïtes dans les histiocytes et fibroblastes, pour constituer des kystes dans le derme (Jacquiet, Liénard, Franc 2010). La maladie progresse en trois phases distinctes (Langenmayer et al. 2015 ; Jacquiet, Liénard, Franc 2010) : la première est la phase aiguë et fébrile. Cette phase initiale, qui dure entre 3 et 10 jours, est caractérisée par une prolifération rapide des tachyzoïtes, provoquant de la fièvre, des écoulements nasaux et oculaires, et des symptômes non spécifiques tels que l'anorexie et la perte de poids. Cette phase peut entraîner des avortements et de l'infertilité masculine, causés par l'hyperthermie et des lésions des testicules. La seconde phase est la phase anasarque qui dure de 1 à 4 semaines et qui est marquée par un œdème sous-cutané, en particulier autour de la tête et du cou, ainsi que par une hypertrophie des nœuds lymphatiques périphériques. Elle est marquée également par l'apparition d'orchite aiguë pouvant provoquer une infertilité transitoire ou permanente (Cortes et al. 2005). La maladie peut être mortelle à ce stade. Enfin la dernière phase est chronique : elle se caractérise par des signes cutanés sévères, notamment une hyperkératose, des dépilations, et la formation de kystes parasites dans divers organes (système cardiovasculaire, muqueuses des voies respiratoires supérieures, foie, rate, myocarde...) et en particulier dans le derme (Jacquiet, Liénard, Franc 2010). Les animaux atteignant cette phase ont souvent une faible valeur économique et sont généralement abattus.

Historiquement, la besnoitiose a été signalée pour la première fois en France et au Portugal à la fin du XIXe siècle (Álvarez-García et al. 2013). Aujourd'hui, elle est considérée comme ré-émergente en Europe, affectant de nouvelles régions en France, en Espagne, en Allemagne, et en Italie (European Food Safety Authority 2010). La maladie est endémique dans certaines régions d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud (Álvarez-García et al. 2013). Plusieurs hypothèses expliquent cette réémergence, notamment l'importation de bovins infectés et certaines pratiques d'élevage. Le changement climatique, en prolongeant les périodes estivales, favorise aussi la prolifération des arthropodes vecteurs de la maladie.

Le cycle de *B. besnoiti* est mal connu. L'hôte définitif reste inconnu, plusieurs espèces comme les chats, les lapins ou les campagnols sont suspectés mais il n'a pas encore été possible de confirmer ces suspicions (Basso et al. 2011). Il est néanmoins acquis que la transmission se fait de manière mécanique par l'intermédiaire d'un vecteur (Alzieu, Desclaux, et al. 2020). *Stomoxys calcitrans* (Diptera : Muscidae), aussi appelée mouche d'étable, a un rôle épidémiologique majeur dans la propagation de la besnoitiose (Sharif et al. 2019) du fait de son caractère hématophage. Suite à un repas de sang interrompu sur un animal infecté, la mouche d'étable peut se poser sur un nouvel hôte et transférer les pathogènes (Baldacchino et al. 2013). *Besnoitia besnoiti* a été observé dans le tube digestif des stomoxes jusqu'à 48 heures après le premier repas de sang (Sharif et al. 2017).

Actuellement, il n'existe pas de vaccin efficace contre la besnoitiose disposant d'autorisation de mise sur le marché en France. Il n'existe pas non plus de médicament efficace qui soit validé à ce jour : la formaldéhyde, la sulfaméthazine et l'oxytétracycline sont actuellement en étude en tant que traitements potentiels chez les bovins (Müller et al. 2019). La lutte contre la maladie repose donc principalement sur une prophylaxie sanitaire, par le dépistage des animaux infectés et leur élimination (Alzieu, Desclaux, et al. 2020), et sur la lutte anti-vectorielle.

Pour la prophylaxie sanitaire, les stratégies incluent la réforme des bovins cliniquement affectés, suivie de l'élimination progressive des animaux asymptomatiques mais séropositifs. Les tests sérologiques, tels que l'ELISA ou le Western Blot, sont utilisés pour identifier les animaux potentiellement porteurs du parasite (Alzieu et al. 2017). Tous les hôtes ne transmettent pas les agents pathogènes de manière égale. Une petite partie de la population est responsable de

la majorité des nouvelles infections (VanderWaal, Ezenwa 2016). Dans le cas de la besnoitiose, cette capacité de transmission est liée à la densité des kystes parasites dans la peau (Alzieu, Jacquet, et al. 2020). On définit comme « *super-spreader* » les animaux présentant de forte densité de kystes parasites dans la peau. La détection précoce des "*super-spreaders*" grâce à la PCR sur des biopsies cutanées, notamment à la base de la queue, permet d'identifier ces individus à fort potentiel de contamination et de réduire la propagation de la maladie (Grisez et al. 2020). Cependant, de faux négatifs peuvent exister (Alzieu, Jacquet, et al. 2020 ; Bottari 2019).

La lutte anti-vectorielle est également un axe principal de la lutte contre la transmission de la besnoitiose. Elle se décline de différentes manières : par piégeage, par lutte chimique, biologique et environnementale. La lutte chimique consiste en l'utilisation d'insecticides pour réduire la population de stomoxes. Plusieurs limites existent à cette méthode notamment l'apparition de résistance à plusieurs molécules utilisées comme les pyréthrinoïdes et l'impact environnemental de celle-ci (Tainchum et al. 2018 ; Pitzer et al. 2010 ; Huo et al. 2021). La lutte biologique repose sur le contrôle des populations de stomoxes par leurs prédateurs naturels comme les guêpes parasitoïdes mais cette lutte n'est pas suffisamment efficace et nécessite un long temps de mise en place (Pickens et al., 1994). La lutte environnementale se base sur le contrôle des lieux de ponte et de vie des stomoxes. De même que pour la lutte biologique, ce moyen de lutte ne suffit pas et nécessite d'être utilisé en association avec d'autres méthodes. Il est également très contraignant pour les éleveurs et peine à être pleinement appliqué dans les élevages (Doud, Taylor, Zurek 2012 ; Rochon et al. 2021). Enfin, la lutte par piégeage va viser les stomoxes et les tabanidés, également responsable de la transmission de *B. besnoiti*. Le piège « Vavoua » est l'un des pièges les plus répandus (Bouyer et al. 2005). Son efficacité dans la capture des stomoxes a été largement démontrée (Mihok, Kang'ethe, Kamau 1995 ; Gilles et al. 2007).

L'objectif de cette étude est d'évaluer sur site, en élevage et en présence de plusieurs lignes de pièges à mouches, la diffusion dans l'espace d'une part des stomoxes, vecteurs potentiels de la besnoitiose, et d'autre part du pathogène *B. besnoiti* porté par ces insectes.

1. Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée sur deux sites et durant deux périodes distinctes, dans un élevage A situé dans le département de l'Aveyron en 2023 et dans un élevage B situé dans le département du Tarn en 2024.

Les élevages ont été sélectionnés pour la présence de deux lots de bovins séparés dans une zone géographique limitée. Le premier lot devait contenir des bovins « super-spreader », c'est-à-dire, présentant des résultats de PCR sur biopsies cutanées positives pour *B. besnoiti*. Le deuxième lot de bovins devait être indemne et séparé du premier. La topographie recherchée pour les élevages doit permettre d'étudier la diffusion spatiale horizontale des stomoxes entre ces deux lots de bovins. Les topographies planes, avec une absence d'obstacles (végétation, habitations...) ont été privilégiées, mais n'ont pas toujours été disponibles.

Les caractéristiques des élevages retenus sont présentées dans la partie 1.2.

1.1. Déploiement des pièges et capture des insectes dans deux élevages infectés

Le protocole d'évaluation de la diffusion du vecteur stomoxe (objectif 1) et du pathogène *B. besnoiti* (objectif 2) consiste à installer trois lignes de pièges entre deux lots de bovins distincts. Le premier lot est considéré comme la source d'infection, il contient des bovins classés comme « *super-spreaders* », c'est-à-dire des bovins dont la PCR sur biopsie de peau est positive pour *B. besnoiti*. Ce lot constitue le foyer infectieux. Le deuxième lot est constitué de bovins non-infectés (séronégatifs). Ils jouent un rôle d'attractifs, attirant les mouches du foyer infectieux vers une zone indemne.

1.1.1. Principes du déploiement des pièges

Un ou plusieurs pièges dits « témoins » ont été placés à proximité immédiate du foyer infectieux (Figure 24). Ils constituent la ligne L0. Il est attendu que ces pièges collectent des stomoxes qui présentent la plus forte probabilité de transporter l'ADN de *B. besnoiti*.

Trois lignes de pièges (L1 à 3) sont placées entre le foyer infectieux et la zone indemne. Chaque ligne est constituée d'un piège de capture, type Vavoua, et de plusieurs pièges de lutte (prototypes expérimentaux en cours de développement). Dans chaque ligne, un piège expérimental et le piège Vavoua possèdent des dispositifs de conservation des insectes (cf Partie 2, paragraphe 2.1), permettant identification, dénombrement et analyse PCR ultérieurs (Figure 24).

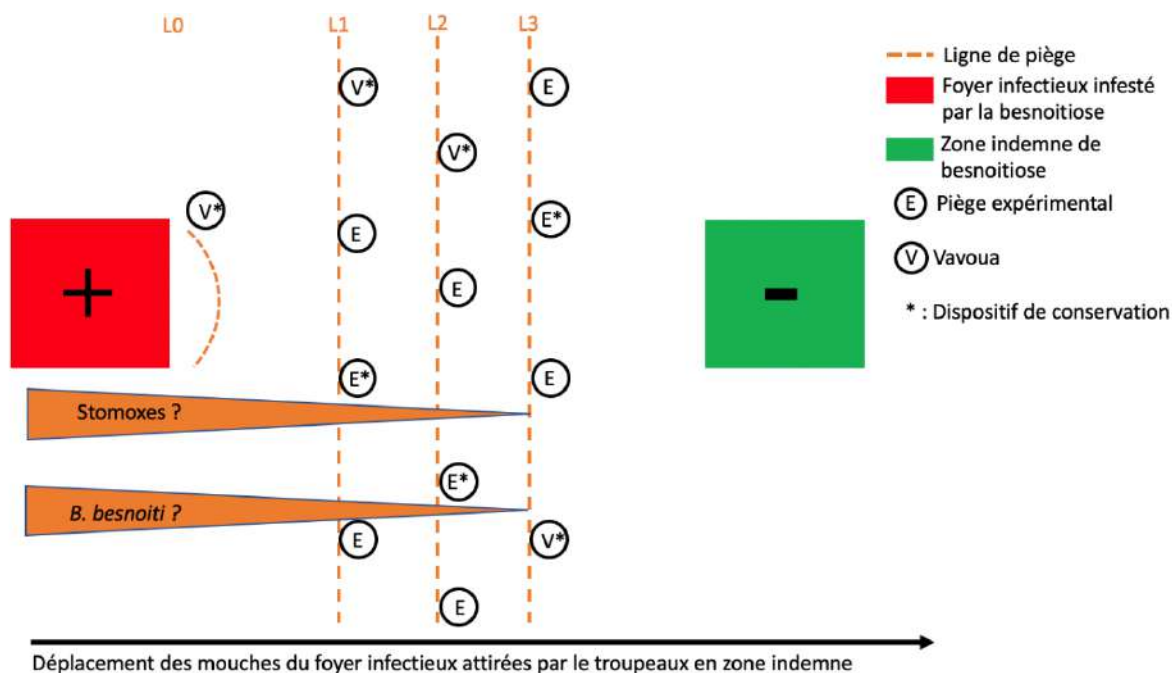


Figure 24 : Représentation schématique de l'expérimentation

Chaque ligne de piège intercepte des insectes et réduit la diffusion des stomoxes, qui ont donc une faible probabilité d'atteindre la dernière ligne du dispositif, à condition que les pièges soient efficaces

1.1.2. Présentation générale des élevages et historique de la besnoitiose

Les élevages A et B sont des élevages de taille moyenne, élevant des bovins de race Limousine à finalité bouchère. Les caractéristiques générales des élevages ainsi que leur historique concernant la besnoitiose sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3 : Caractéristiques générales et historique de la besnoitiose des élevages A et B.

	Élevage A	Élevage B
Informations générales		
Date de création	Reprise du troupeau familial	2002 (reprise d'un troupeau déjà existant)
Production	Allaitante	Allaitante
Race	Limousine	Limousine
Nombre de mères	84	85
Reproduction	100% IA	90% monte naturelle ; 10% IA
Renouvellement	100% achat	Relève de veaux, achat peu fréquent
Informations relatives à la besnoitiose		
Raison campagne prophylactique	Suite à présence de cas clinique dans l'élevage	Recherche systématique dans le Tarn cette année là
Date et nature du 1 ^{er} cas clinique	Août 2019	Février 2023
Nombre de cas cliniques	Multiple (nombre inconnu)	3 et 2 suspicions réformées
Origine de la maladie	Achat d'un bovin séropositif en 2018	Introduction suite à un achat
Nombre de cas positifs à la sérologie individuelle	28	16
Nombre de bovin positifs à la PCR sur peau	4	6

Dans l'élevage A, le taux de séropositivité du troupeau est passé de 85% à 62% entre la prophylaxie de 2021 et celle de 2023, suite aux réformes réalisées par l'éleveur. Les valeurs de Ct (*Cycle threshold*) des PCR sur peau des 4 bovins « *super-spreader* » varient entre 18,08 et 33,21.

Dans l'élevage B, les valeurs de Ct des PCR sur peau des 6 bovins « *super-spreader* » chez lesquels l'ADN de *B. besnoiti* a été détecté varient entre 25,93 et 35,46.

Les valeurs de Ct des animaux des deux élevages sont disponibles en Annexe 1.

1.1.3. Étude réalisée dans l'élevage A

La première expérience a été réalisée entre le 23 Mai 2023 et le 07 Juillet 2023 dans l'élevage A dans le département de l'Aveyron avec la contribution de Théotime Guiffray, stagiaire au sein service de Parasitologie de l'ENVT.

Quatre bovins « *super-spreader* » ont été identifiés et isolés dans un bâtiment ouvert. Le bâtiment adjacent contenait des vaches dont certaines étaient positives en

sérologie mais toutes étaient négatives à la PCR sur peau. Ces deux troupeaux sans vis-à-vis mais assez proches étaient considérés comme le « foyer infectieux ».

Un lot de génisses négatives à la sérologie était situé en contrebas ; ces animaux étaient maintenus à une distance minimale de 60 m du lot de vaches et pâturaient en « zone indemne » (Figure 25).

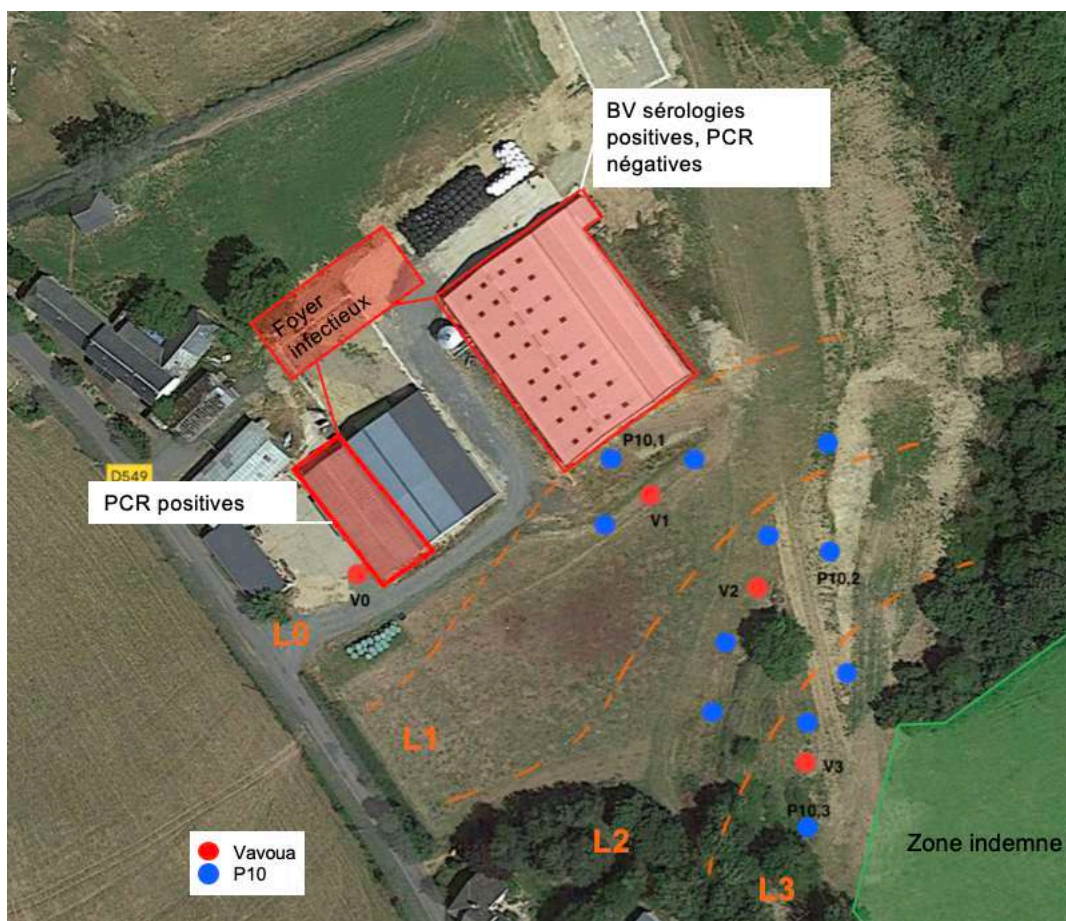


Figure 25 : Plan de l'installation de l'expérience sur le site de l'élevage A (Capture d'écran Google Maps du 28/06/2024)

Le piège Vavoua « témoin » V0, muni d'un dispositif de conservation, a été positionné aux abords de l'étable du lot des 4 « *super-spreader* » et constituait le témoin positif (ligne L0). Les lignes de pièges ont été installées sur la parcelle de terrain séparant les deux groupes. Les trois lignes, espacées d'environ 30 m, comprenaient 5 pièges chacune. La topographie du site a imposé une contrainte rendant difficile un placement équidistant des pièges dans certains cas.

Les pièges expérimentaux utilisés lors de cette expérience sont des pièges P10 (Figure 26), évalués lors de la thèse expérimentale de Lucas Miquel (Miquel 2023).

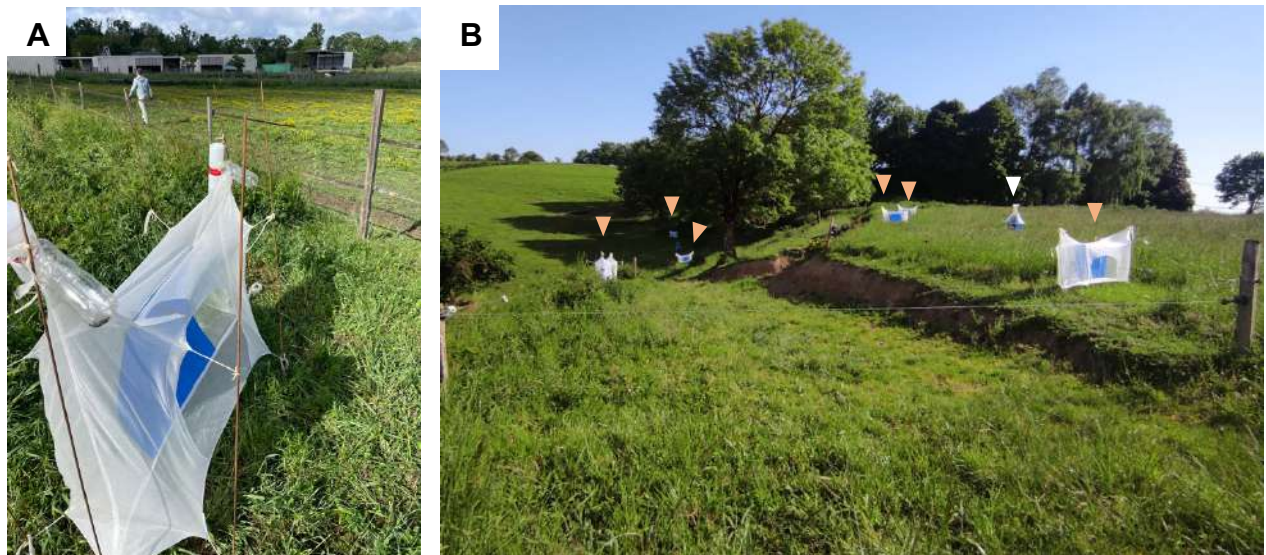


Figure 26 : (A) Photographie d'un piège P10 avec dispositif de conservation (B) Photographie de l'expérimentation sur le site de l'élevage A avec visualisation de piège Vavoua (tête de flèche blanche) et P10 (têtes de flèche orange) (photographies originales de T.Guiffroy et M.Desquesnes).

Les flacons des dispositifs de conservation contenaient au début de l'étude du savon, puis de l'alcool. Les conditions de conservation sont détaillées pour chaque lot dans l'Annexe 2. Du fait de la dégradation importante des insectes, leur identification et dénombrement n'ont pas été effectués. Malgré ces mauvaises conditions de conservation (inadaptation du savon pour la conservation, et dilution accidentelle de la solution alcoolique par les pluies), un nombre limité d'échantillonnages de stomoxes réalisés par la collecte occasionnelle des insectes à brefs intervalles de temps, a permis de réaliser des extractions d'ADN pour PCR.

1.1.4. Étude réalisée dans l'élevage B

La seconde expérience a été réalisée entre le 19 mars 2024 et le 10 juillet 2024. Le site qui a fait l'objet de l'étude est situé dans le département du Tarn. Il est composé d'un bâtiment, d'une stabulation et d'un parcellaire de pâturage d'environ 15 hectares.

Sur ce site étaient présents 90 bovins dont 21 étaient positifs à la sérologie besnoitiose lors de la campagne de prophylaxie de 2024. Des PCR de peau ont été réalisées et 6 bovins ont été positifs (« *super-spreaders* »). Suite à ces résultats, seuls 25 bovins ont été laissés sur le site de l'élevage B : 6 avec PCR sur peau positives, 16 positifs à la sérologie mais avec PCR sur peau négatives et 3 séronégatifs. Du 27 mars au 25 juin 2024, ces bovins étaient situés dans la stabulation et pâturaient dans

la zone avoisinante indiquée en rouge et baptisée « foyer infectieux » à la figure 27. L'élevage voisin, avec une clôture mitoyenne, possédait des bovins dépistés négatifs à la dernière campagne de prophylaxie et constituait la zone indemne.

Cinq pièges (V0.1 à 4 et P23.0) ont été installés à proximité immédiate du foyer infectieux (dont 1 à l'intérieur de l'étable) et constituaient la ligne L0 (Figure 27). Trois lignes de pièges (L1-3) ont été installées entre le foyer infectieux et la zone indemne, sur une zone légèrement en pente ascendante de la première à la troisième ligne. La première ligne L1 a été installée à 5 mètres du bord de la parcelle, et donc du foyer infectieux. Les lignes étaient séparées d'une distance de 28 mètres (Figure 27 et 28). Les pièges de chaque ligne étaient espacés de 25 mètres. Les pièges expérimentaux utilisés lors de cette expérience étaient des pièges P23 (Figure 29, B). Un piège Vavoua (V4) constituait le témoin dit « négatif » (Figure 29, C) ; il était à 50 mètres de la ligne 3, à la limite de la propriété, et très proche de l'étable de l'élevage voisin non-infecté (zone indemne).

Les dispositifs de capture comprenaient un flacon avec de l'alcool servant à la conservation des insectes jusqu'à leur récolte. Une fois récoltés, les insectes ont été identifiés et dénombrés. Les stomoxes ont été ensuite conservés dans de l'alcool à 70% et réfrigérés jusqu'à l'extraction d'ADN.

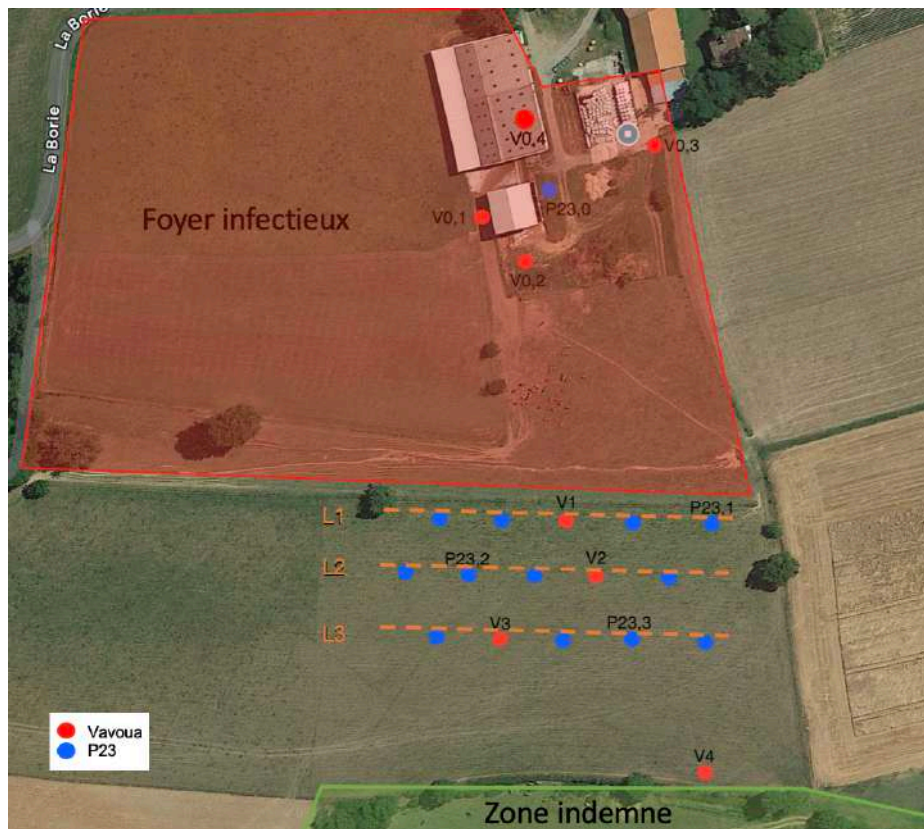


Figure 27 : Plan de l'installation sur le site de l'élevage B (Capture d'écran Google Maps (du 27/03/2024)).



Figure 28 : Installation sur le site de l'élevage B avec visualisation des lignes 1, 2 et 3 et de piège Vavoua (têtes de flèche blanche) et P23 (têtes de flèche orange).



Figure 29 : Photographies du piège Vavoua en position V4 avec l'élevage voisin en arrière-plan (A), d'un piège P23 avec l'élevage B en arrière-plan (B), du piège Vavoua V0,4 dans la stabulation (C).

Dans les 2 élevages, les populations de mouches piqueuses étaient constituées presque exclusivement de *S. calcitrans* (de très rares tabanidés ont été observés). Après identification, les stomoxes étaient dénombrés et la densité apparente par type de piège et par jour (DAP) était calculée pour chaque ligne de piège.

1.2. Détection de l'ADN de *Besnoitia besnoiti* par PCR en temps réel

La détection de l'ADN du parasite *B. besnoiti* a déjà été réalisée en conditions de laboratoire sur des stomoxes d'élevages directement exposés à du sang artificiellement infecté (Sharif 2018). Dans le cadre de notre étude, la recherche d'ADN de *B. besnoiti* a été réalisée par PCR en temps réel à l'aide du kit AdiaVet™ comme précédemment décrit (Sharif et al. 2017) et qui sera présentée ci-après.

1.2.1. Extraction de l'ADN

Après l'identification, les stomoxes ont été comptés, regroupés dans des flacons d'alcool étiquetés pour indiquer le lieu de capture dans le dispositif expérimental, et conservés au réfrigérateur.

L'étape suivante consistait à réaliser l'extraction d'ADN. Dans l'élevage A, l'extraction a été réalisée soit sur du sang extrait d'abdomen de stomoxes (récolté à l'aiguille fine) soit sur des abdomens entiers détachés du corps de l'insecte à l'aide de pinces fines. Le détail figure dans l'Annexe 2. Dans l'élevage B, toutes les extractions ont été réalisées sur abdomens entiers de stomoxes. Des lots ont été constitués,

comprenant 1 à 10 abdomens de stomoxes, en privilégiant ceux qui étaient les plus gonflés ou avec une visualisation de sang, afin de sélectionner des stomoxes ayant initié ou effectué un repas sanguin (Figure 30).

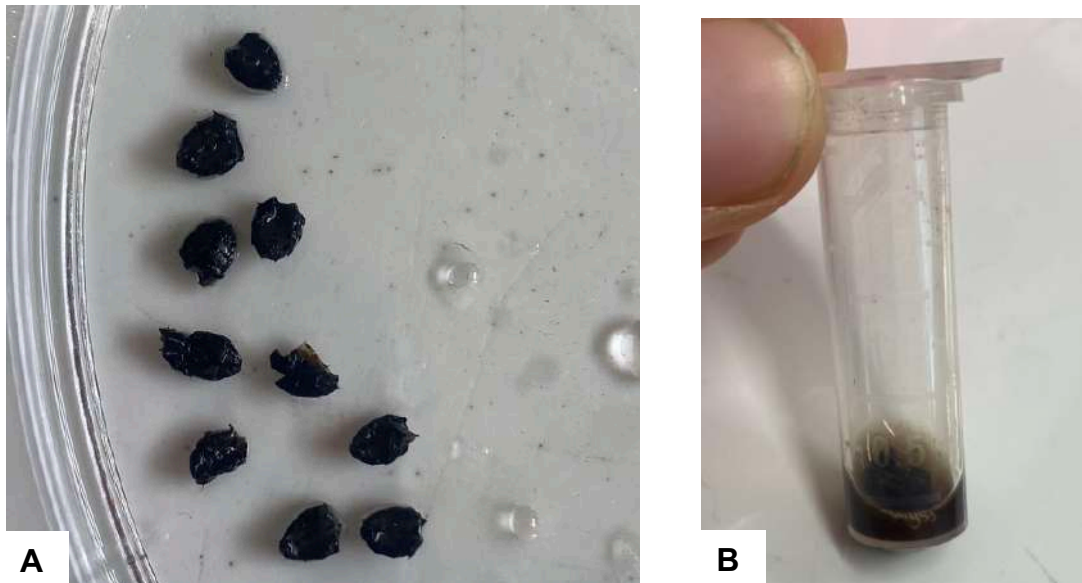


Figure 30 : (A) Abdomens de stomoxes disposés sur une boîte de pétri ; (B) Échantillon hydrolysé suite à l'étape de « Lyse 2 ».

Une fois les lots constitués, l'extraction de l'ADN a été faite sur chacun d'eux à l'aide du kit « QIAamp^R DNA Mini Kit (250) » en suivant le protocole d'extraction préconisé par le fabricant, et décrit au Tableau 4. Les tubes ont été conservés entre 2 et 8 °C si l'analyse PCR était réalisée dans les 24 heures, ou stockés à -20 +/- 5°C si elle devait être effectuée au-delà de ce délai.

Tableau 4 : Protocole d'extraction à l'aide du kit « QIAamp^R DNA Mini Kit ». Les « buffers » ATL, AL, AW1, AW2 et AE sont issus du kit.

	Dans un Eppendorf (2 ml) déposer l'échantillon à extraire
Lyse 1	Ajouter 180 µl de « Buffer ATL », 20 µl de protéinase K
Incubation 1	Incuber 30 min au bloc chauffant à 70°C
Lyse 2	Ajouter 200 µL de « Buffer AL »
Incubation 2	<p>Incuber 10 min au bloc chauffant à 70 °C Ajouter 210 µl d'éthanol (96-100 %) Vortexer 15 secondes (centrifuger brièvement pour faire tomber les gouttes si nécessaire) Transférer la totalité de chaque échantillon sur une colonne. <i>Centrifuger 1 minute 10 000 g</i> Changer la colonne de tube collecteur. Ajouter 500 µl de « Buffer AW1 ». <i>Centrifuger 1 minute 10 000g.</i> Changer la colonne de tube collecteur. Ajouter 500 µl de « Buffer AW2 ». <i>Centrifuger 3 minutes 10 000g.</i> Changer la colonne de tube collecteur. <i>Centrifuger 1 minute 10 000g.</i> Transférer la colonne sur un microtube de 1,5 ml. Déposer 200 µl de « Buffer AE ».</p>
Incubation 3	<p>Incuber 1 minute à température ambiante <i>Centrifuger 1 minute 10 000g</i></p>

1.2.2. Exécution de la PCR en temps réel

L'amplification par PCR en temps réel a été réalisée avec le kit « AdiaVetTM Besnoitia real time » (BioX-Diagnostics®, Jemelle, Belgique) sur le thermocycleur MX3005P de Stratagène (Figure 39, A). Il s'agit d'une PCR duplex permettant simultanément la recherche d'ADN de bovin et celle d'ADN de *Besnoitia besnoiti*. Ainsi, le « mix » du kit est composé d'une part d'un couple d'amorces et d'une sonde TaqMan marquée en FAM (carboxyfluorescéine) ciblant le fragment ITS-1 (« *internal transcribed spacer 1* ») d'ADN ribosomal de *B. besnoiti* (séquence des amorces non disponible car sous licence), et d'autre part d'un couple d'amorces et d'une sonde TaqMan marquée en HEX ciblant la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) bovine.

Sur une plaque de PCR ont été introduits dans chaque puits 20 µl de mix et 5 µl de l'échantillon d'ADN précédemment extrait. Il a été également ajouté un puits contenant un témoin d'extraction sans ADN, devant donc être négatif, et un puits

témoin positif avec de l'ADN de *B. besnoiti*, fourni par le fabricant. Chaque flacon de mix a été vérifié à chaque ouverture, c'est-à-dire qu'il a été testé à part pour vérifier l'absence de contamination par de l'ADN de *B. besnoiti*. La programmation de la PCR en temps réel a été réalisée sur le logiciel MxPro (Figure 31, B) selon les conditions préconisées dans le protocole du kit commercial (voir Annexe 3).

La valeur seuil de cycle Ct de détection d'ADN parasite a été fixée inférieure ou égale à 40 d'après l'étude de Sharif en 2019.

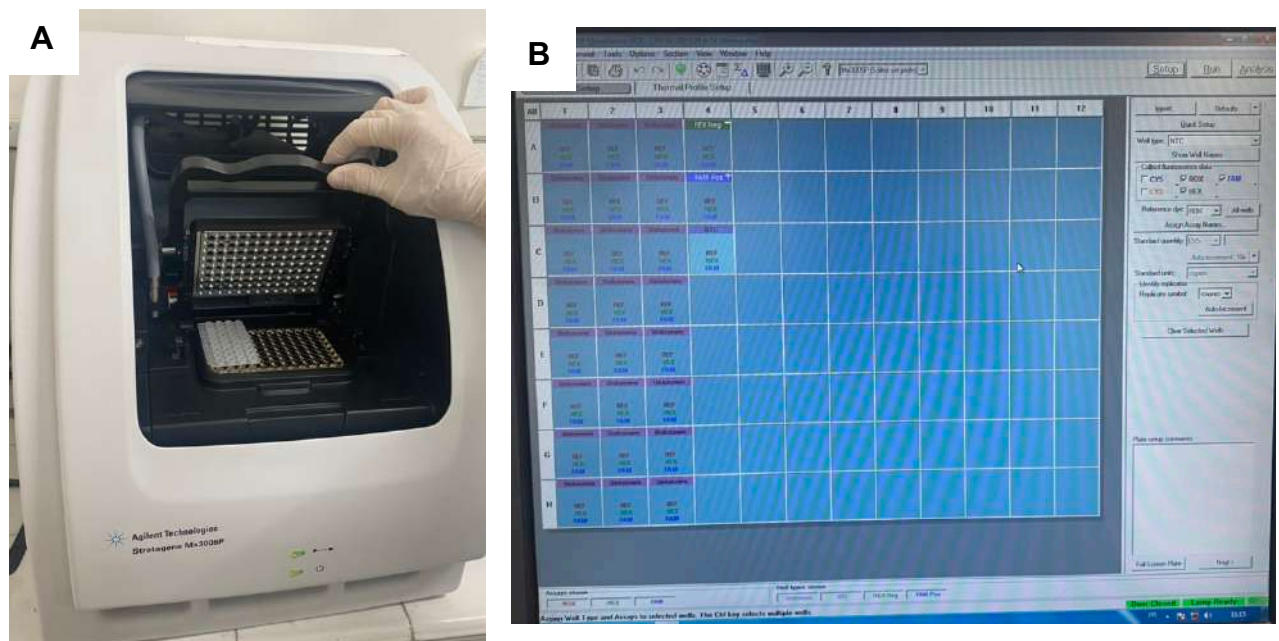


Figure 31 : (A) Mise en place de la plaque de PCR dans le thermocycleur Stratagène Mx3005P ; (B) Programmation d'une série de PCR en temps réel sur le logiciel MxPro avec, sur la 4^e colonne de haut en bas, le témoin négatif, le témoin positif et le mix.

2. Résultats

2.1. Diffusion dans l'espace des stomoxes en présence de pièges à mouches hématophages

Suite au problème de conservation des insectes collectés sur l'élevage A, cette étude n'a pu être réalisée que sur l'élevage B. Un total de 13.639 stomoxes a été comptabilisé entre le 03/04/2024 et le 08/07/2024. Les lignes de pièges ont été retirées le 25/06/2024 du fait de l'utilisation de la parcelle par le propriétaire pour le pâturage de ses bovins. Elles sont donc restées en place pendant 83 jours.

Les données recueillies sont consignées dans l'Annexe 4. Les DAP des stomoxes sont représentées sous forme d'histogramme dans la Figure 32

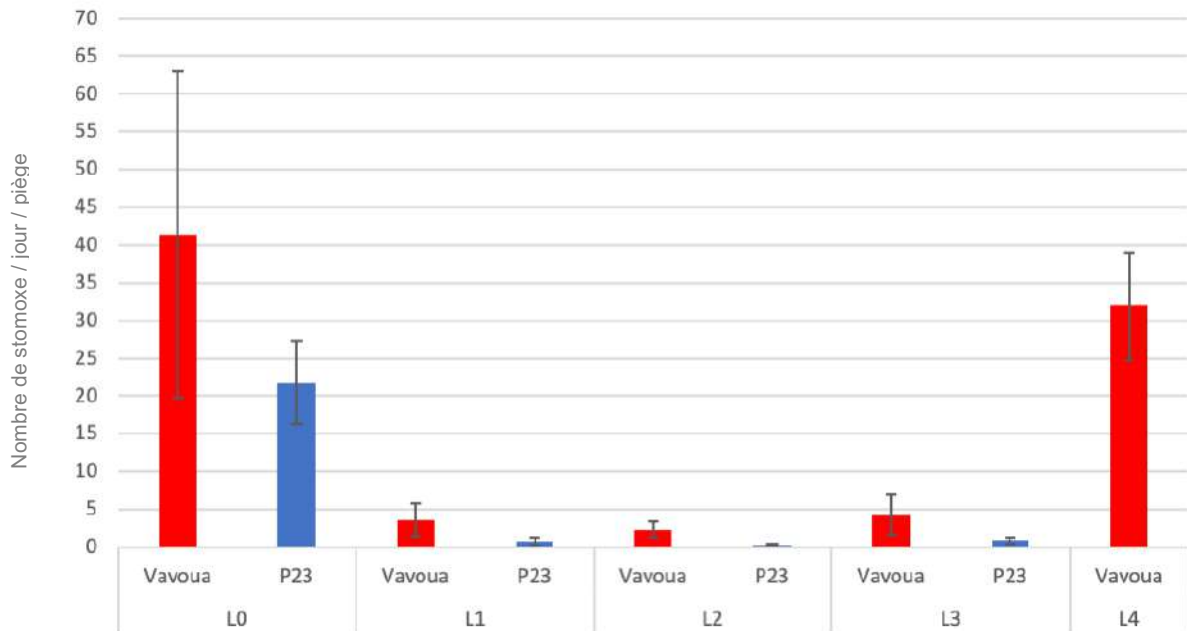


Figure 32 : Histogramme des densités apparentes moyennes en fonction de la position et du type de piège. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types de chaque série.

On observe une décroissance des densités apparentes moyennes des lignes L0 à L2. Cela indique, sur les surfaces couvertes par les 3 premières lignes de pièges, une diminution progressive du nombre de stomoxes proportionnelle à la distance du lieu de séjour du troupeau de bovin. On observe cependant une inversion de tendance à la ligne de pièges L3, avec une augmentation modérée en L3, puis très forte en L4. Il apparaît donc que sur les surfaces couvertes par les lignes L3 et L4, la densité apparente croît en même temps que la distance au foyer infectieux.

On observe également que le taux de capture des pièges expérimentaux « P23 » est systématiquement inférieur à celui des pièges Vavoua, et pour la ligne la plus significative (L0), d'environ 50%.

2.2. Propagation dans l'espace du pathogène *B. besnoiti*.

La taille des lots sur lesquels ont été réalisées les PCR, incluant 1 à 10 stomoxes, est renseignée pour chaque PCR dans l'Annexe 2 pour l'élevage A et dans l'Annexe 5 pour l'élevage B, avec les résultats des tests.

2.2.1. Élevage A

Pour l'élevage A, 42 lots comprenant un total de 291 stomoxes ont été constitués et testés. Parmi ceux-ci, 32 lots, soit 76%, démontrent la présence d'ADN de bovins (Ct allant de 26 à 38), lequel est retrouvé jusqu'en ligne L3 (Figure 33).

La recherche d'ADN de *B. besnoiti* montre que sur les 42 lots de stomoxes, trois sont positifs avec des valeurs de Ct allant de 30 à 36. Ces 3 lots provenaient de la ligne L0 (piège V0), disposée à proximité immédiate des bovins, et faisaient partie des 22 lots positifs pour l'ADN de bovins (Figure 34).

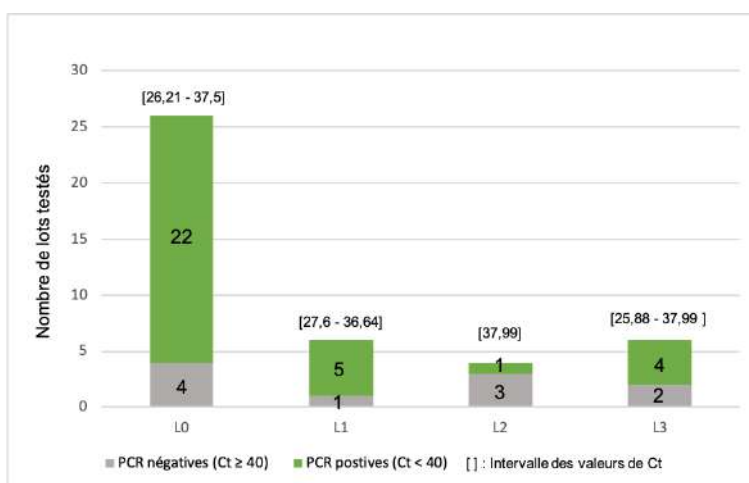


Figure 33 : Histogramme empilé des résultats de la PCR sur extraits de stomoxes pour la recherche d'ADN de bovin dans l'élevage A avec répartition des résultats positifs et négatifs pour chaque ligne de piège.

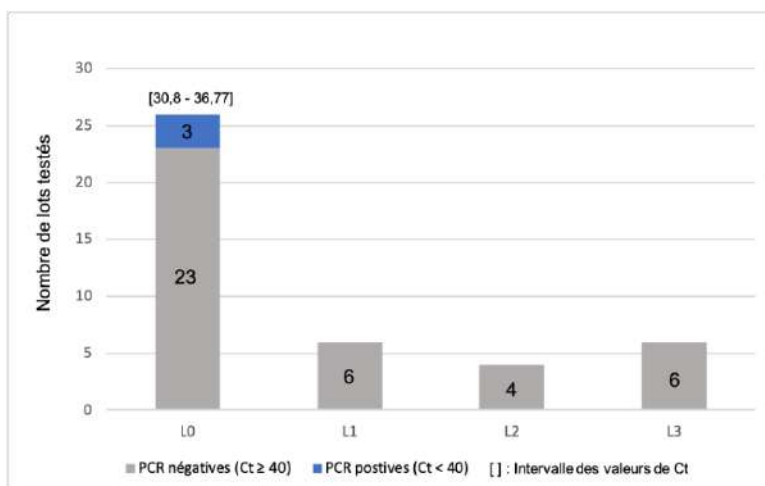


Figure 34 : Histogramme empilé des résultats de la PCR sur extraits de stomoxes pour la recherche d'ADN de *B. besnoiti* dans l'élevage A avec répartition des résultats positifs et négatifs pour chaque ligne de piège.

2.2.2. Élevage B

Pour l'élevage B, 131 lots comprenant un total de 1187 stomoxes ont été constitués et testés. Parmi ceux-ci, 30 lots, soit 29%, démontrent la présence d'ADN de bovin (Ct allant de 26 à 39), lequel est retrouvé sur toutes les lignes, avec une fréquence de lots positifs plus importante dans les lots collectés proches des bovins « *super-spreader* » (Figure 35).

La recherche d'ADN de *B. besnoiti* montre que sur les 131 lots de stomoxes, 10 sont positifs avec des valeurs de Ct allant de 38 à 40 (Figure 36). Ces 10 lots proviennent de stomoxes collectés dans l'étable, à proximité immédiate des bovins (ligne L0), ainsi que sur les lignes L1, L2, et L3 ; toutefois aucune PCR *Besnoitia* n'a été positive sur les mouches capturées en L4. Le nombre de lots positifs en ces différents lieux n'était pas très différent, variant de 1 à 3. Enfin, de manière inattendue, 4 des 10 lots avec présence d'ADN de *B. besnoiti* ne présentaient pas de trace d'ADN de bovins.

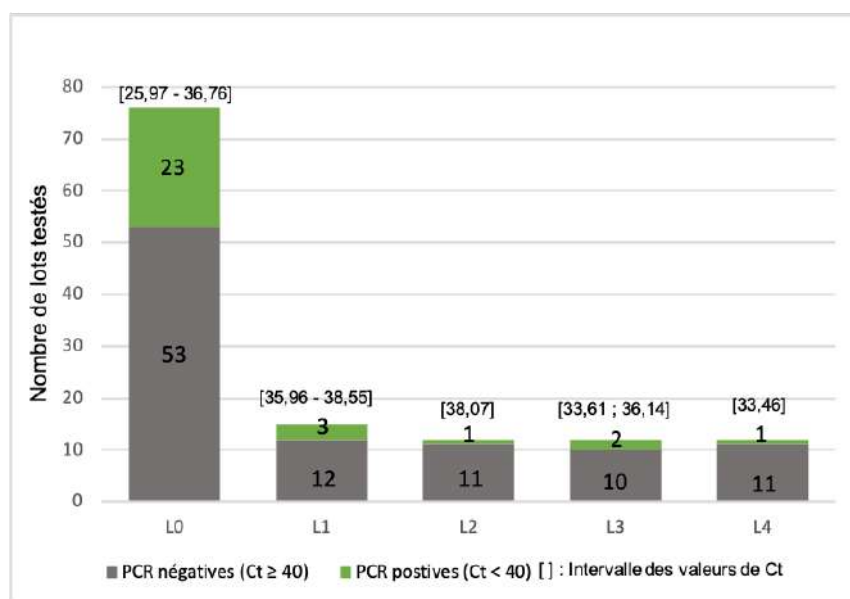


Figure 35 : Histogramme empilé des résultats de la PCR sur extraits de stomoxes pour la recherche d'ADN de bovin dans l'élevage B avec répartition des résultats positifs et négatifs pour chaque ligne de piège.

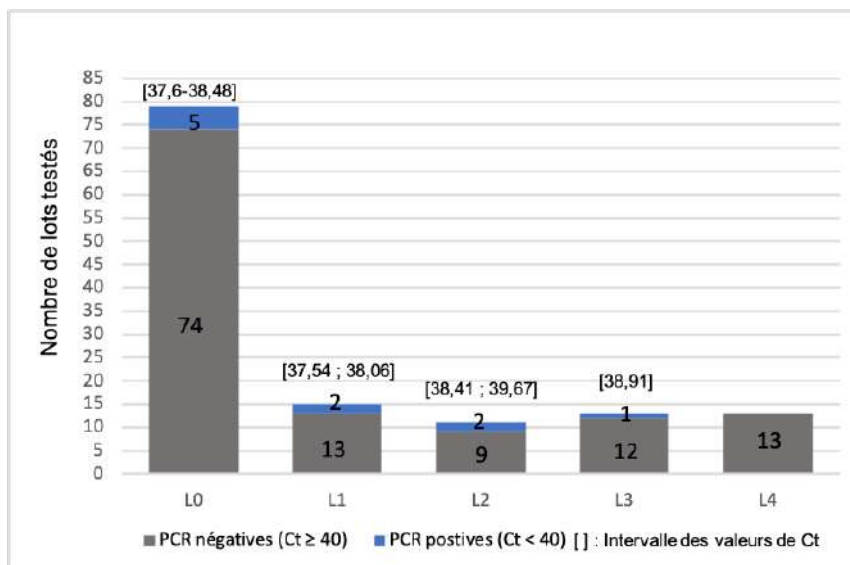


Figure 36 : Histogramme empilé des résultats de la PCR sur extraits de stomoxes pour la recherche d'ADN de *B. besnoiti* dans l'élevage B avec répartition des résultats positifs et négatifs pour chaque ligne de piège.

3. Discussion

L'étude de la diffusion des stomoxes dans l'espace sur l'élevage A a souffert de problèmes de conservation des insectes, ne permettant pas de conduire in fine l'étude. Pour l'élevage B, les conditions météorologiques défavorables ont conduit à des captures basses des lignes L0 et L4 et quasiment nulles des lignes L1, L2 et L3 avec une pluviométrie de 358,6 mm sur le mois de mai pour une normale saisonnière à 78,9 mm (Source : infoclimat.fr). Les données recueillies ont néanmoins permis de conduire l'étude dans ce second cas.

Dans l'élevage B, l'étude met en évidence une inversion de tendance à partir de la ligne L3. Cela suggère qu'une source de stomoxes est localisée en aval et proche de la ligne L4 : cette source correspond très certainement à l'élevage voisin dont l'étable principale est située à une dizaine de mètres de la ligne L4, et possiblement à l'origine de stomoxes qui rayonnent jusqu'à la ligne L3 où l'on observe une légère augmentation par rapport à la ligne L2. Il est nécessaire d'intégrer l'existence de cette seconde source de stomoxes pour évaluer la distance de propagation de l'insecte, puisqu'au-delà de la ligne L2, les stomoxes proviennent très probablement principalement de l'élevage voisin. La disposition des lignes de pièges, espacées de 28m avec une distance de 5 mètres au départ, indique donc que la distance de propagation des stomoxes est de l'ordre de 61 m.

Les distances de propagation de stomoxes suggérées par notre étude sont plus importantes que celles précédemment établies. Il a été décrit que suite à un premier repas de sang interrompu, l'insecte cherche alors un nouvel hôte dans un rayon pouvant s'étendre jusqu'à 25 mètres, mais le plus souvent entre 5 et 10 mètres (Figure 37) (Alzieu, Jacquet 2016).

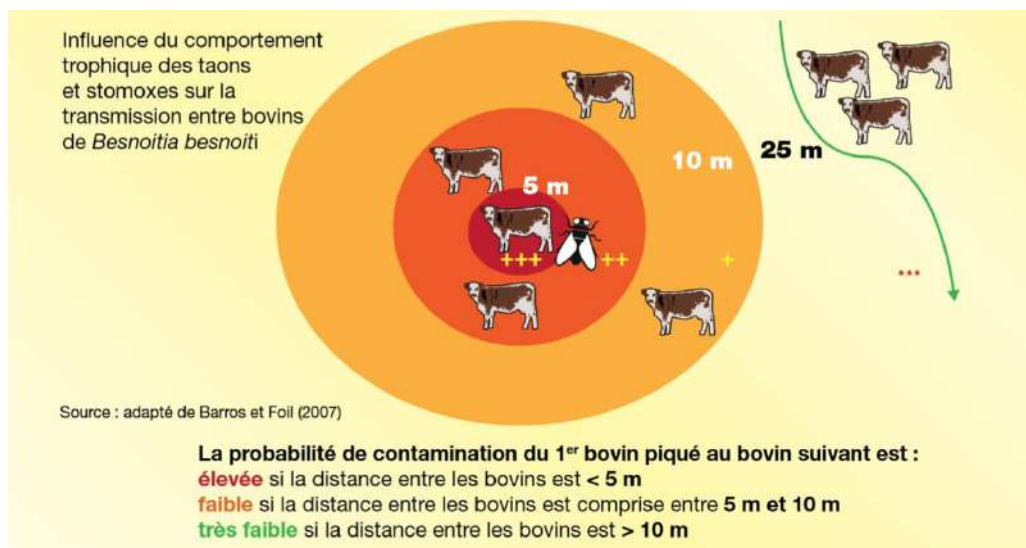


Figure 37 : Rayon d'action des tabanidés et stomoxes lors de la compétition du repas de sang chez les bovins (Alzieu, Jacquet 2016).

Il aurait été intéressant d'étudier la capacité des lignes de pièges à entraver la propagation de *B. besnoiti*. Pour cela, l'expérience aurait pu être conduite en deux temps. Dans un premier temps, l'expérience aurait été réalisée uniquement avec des pièges « Vavoua », en nombre restreint, servant de pièges de mesure. Dans un second temps, elle aurait été menée avec des pièges de mesure, mais aussi en présence de lignes de pièges en nombre important, servant à la capture. Si la pression parasitaire et la disponibilité du vecteur sont identiques sur les 2 expériences, l'impact de déploiement des pièges sur la propagation des stomoxes pourrait être évalué.

Le second objectif de cette étude était d'évaluer en élevage la diffusion dans l'espace du pathogène *B. besnoiti* en présence de pièges à mouches. Les résultats obtenus sur les deux élevages conduisent à des conclusions très différentes.

Pour l'élevage A, la distance entre les lignes de piège étant de 30m, les résultats indiquent que les stomoxes capturés près du foyer infectieux ont peu tendance à s'en éloigner. La présence d'ADN de *B. besnoiti* n'ayant pu être détectée que dans des lots collectés au niveau de la ligne L0. Ceci suggère que le pathogène *B. besnoiti* n'a été

transporté qu'à des distances très courtes, inférieures à 30m, distance à laquelle se trouvait la ligne L1 exempte de stomoxes porteurs d'ADN de *B. besnoiti*. L'échantillonnage réduit de l'étude sur cet élevage appelle à considérer la conclusion de l'étude avec réserve.

Pour l'élevage B, la présence d'ADN de *B. besnoiti* en ligne L3, alors que l'élevage voisin est indemne, suggère une propagation à 61 m. La présence d'ADN de *B. besnoiti* a été détecté sur toutes les lignes testées, à l'exception de la ligne de piège L4 la plus éloignée. Ces observations pourraient indiquer une distance importante de propagation du pathogène *B. besnoiti*, allant entre 61 et 111m (distance de la ligne L4 depuis le début de la parcelle). Soulignons aussi un résultat inattendu : un résultat de PCR positif pour l'ADN de *B. besnoiti* n'est pas toujours corrélé à un résultat de PCR positif pour l'ADN bovin. Cela pourrait suggérer une vitesse de dégradation plus rapide de l'ADN de bovin par rapport à celui de *B. besnoiti*.

Un des points centraux dans l'étude est l'identification de l'ADN de *B. besnoiti* par PCR. Ceci avait précédemment été réalisé dans des conditions de laboratoire (Sharif et al. 2017), mais n'avait pas encore été établi en élevage. Mes résultats indiquent que cela est réalisable, 13 lots ayant conduit à des PCR positives dans nos expériences.

Néanmoins, le nombre de lots testés positifs reste faible et les valeurs de Ct très hautes. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces résultats. Premièrement, pour avoir un résultat positif, il faut que la PCR ait été faite sur un stomoxe ayant réalisé un repas de sang avec présence de bradyzoïtes. Seule une faible proportion des bovins de l'étude sont positifs à la PCR sur peau (24% pour l'élevage B) ce qui diminue la probabilité d'avoir sélectionné pour la PCR un insecte ayant réalisé un repas de sang sur un bovin positif à la PCR sur peau. De plus, il faut que le stomoxe ait prélevé dans des zones riches en kystes parasitaires. En effet, la répartition des kystes dermiques n'est pas homogène sur l'ensemble d'un individu en dehors des bovins ayant fait une phase clinique (Bottari 2019), se localisant préférentiellement dans la zone péri-anale.

Deuxièmement, la quantité d'ADN de *B. besnoiti* diminue rapidement dans les pièces buccales et dans le contenu abdominal de *S. calcitrans*, jusqu'à n'être plus détectable au-delà de 96 heures (Sharif et al. 2017). L'intervalle entre le repas sanguin et l'arrivée dans la solution alcoolique du stomoxe apparaît donc être essentiel dans l'issu du test PCR. Si cette durée dépasse celle de dégradation de l'ADN de *B. besnoiti*,

il n'est alors plus possible de le détecter lors de l'analyse PCR et cela induit des résultats négatifs. Le temps entre l'extraction de l'ADN et le repas de sang du stomoxe étudié est donc un facteur limitant la détection de l'ADN de *B. besnoiti*. Enfin la pluviométrie importante durant les expérimentations a pu conduire à la dilution de la solution alcoolique à l'intérieur des dispositifs de conservation, avec pour conséquence une diminution voire une perte de protection de la préservation de l'ADN de *B. besnoiti*. Cette difficulté pourrait partiellement être contournée en relevant le seuil (Ct) à partir duquel un test PCR est considéré positif, ce qui permettrait de révéler des traces d'ADN encore moins abondantes dans les échantillons testés. Il conviendrait alors de définir ce nouveau seuil, en veillant à ce qu'il reste discriminant pour des échantillons exemptes d'ADN de *B. besnoiti*.

4. Conclusion

Cette étude dans deux élevages permet de proposer que les stomoxes rayonnent à une distance pouvant atteindre 61m, ceci en présence de pièges de capture de mouches hématophages. Une propagation à plus longue distance pourrait cependant être observée en absence de piégeages.

Cette étude a également démontré la possibilité de détecter de l'ADN de *B. besnoiti* dans *S. calcitrans* en élevage, c'est à dire dans des conditions « naturelles » d'élevage en utilisant la technique de PCR en temps réel. Cette méthodologie évalue la distance de propagation du pathogène *B. besnoiti* par *S. calcitrans*, à 30m dans le cas de l'élevage A, et jusque 96m pour l'élevage B. Par là-même, elle suggère que les stomoxes rayonnent probablement au-delà de 61m, distance au-delà de laquelle l'ADN de *B. besnoiti* n'a pourtant pas pu être détecté.

Dans l'ensemble, ces observations confirment la pertinence des recommandations actuelles de conduite d'élevage dans les élevages infectés qui préconisent de séparer géographiquement les lots infectés des lots sains d'un minimum de 100 mètres et idéalement d'une distance supérieure à 300 mètres.

Références bibliographiques

ÁLVAREZ-GARCÍA, G., FREY, C. F., MORA, L. M O et SCHARES, G., 2013. A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends in Parasitology*. 2013. Vol. 29, n° 8, pp. 407-415. DOI 10.1016/j.pt.2013.06.002.

ALZIEU, J-P. et JACQUIET, P., 2016. La besnoitiose bovine : actualités physiopathogéniques, cliniques et épidémiologiques. 2016. Vol. Bulletin des GTV, n° n°84, pp. 67-78.

ALZIEU, J-P, DESCLAUX, X., PEREZ, L., JACQUIET, P., PREVOT, F., GRISEZ, C., BOTTARI, L., BOULON, L., MEJEAN, F., LACZ, C., PAILLAS, J-M et LOCATELLI, C., 2020. Besnoitiose : le panel diagnostique s'étoffe. *LA SEMAINE VÉTÉRINAIRE • nos 1851 et 1852 •*. 2020.

ALZIEU, J-P, JACQUIET, P., BOULON, C., DEVOS, J., LEMAIRE, M., DESCLAUX, X., RAMEIL, M., GRISEZ, C. et MEJEAN, F., 2020. La besnoitiose bovine : stratégies de prévention et d'assainissement en cheptels infectés. 2020.

ALZIEU, J-P, JACQUIET, P., BOULON, C., MEJEAN, F., DESCLAUX, X., PREVOT, F., FRANC, M., RAMEIL, M., GRISEZ, C., MALAVIEILLE, R., BOUHSIRA, E. et LIÉNARD, E., 2017. La besnoitiose bovine : moyens de diagnostic et stratégies possibles de contrôle. *Bulletin des GTV - N°85*. 2017.

BALDACCHINO, F., MUENWORN, V., DESQUESNES, M., DESOLI, F., CHAROENVIRIYAPHAP, T. et DUVALLET, G., 2013. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*. 2013. Vol. 20, pp. 26. DOI 10.1051/parasite/2013026.

BASSO, W., SCHARES, G., GOLLNICK, N.S., RÜTTEN, M. et DEPLAZES, P., 2011. Exploring the life cycle of *Besnoitia besnoiti*—Experimental infection of putative definitive and intermediate host species. *Veterinary Parasitology*. 2011. Vol. 178, n° 3-4, pp. 223-234. DOI 10.1016/j.vetpar.2011.01.027.

BOTTARI, L., 2019. La besnoitiose bovine : utilisation de la biopsie cutanée comme un outil diagnostique des individus forts contaminateurs et stratégie d'assainissement des troupeaux à forte séroprévalence. Thèse d'exercice de Médecine vétérinaire. Université 3 Paul Sabatier. 2019.

BOUYER, J., DESQUESNES, M., DIA, M. L., KABORÉ, I. et GILLES, J., 2005. Le piégeage des insectes vecteurs. *CIRDES. Santé animale en Afrique de l'Ouest*. 2005. Fiche n°20.

CORTES, H., LEITÃO, A., VIDAL, R., VILA-VIÇOSA, M. J., FERREIRA, M. L., CAEIRO, V. et HJERPE, C. A., 2005. Besnoitiosis in bulls in Portugal. *Veterinary Record*. 2005. Vol. 157, n° 9, pp. 262-264. DOI 10.1136/vr.157.9.262.

DOUD, C. W., TAYLOR, D. B. et ZUREK, L., 2012. Dewatered Sewage Biosolids Provide a Productive Larval Habitat for Stable Flies and House Flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*. 2012. Vol. 49, n° 2, pp. 286-292. DOI 10.1603/ME11158.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2010. Bovine Besnoitiosis: An emerging disease in Europe. *EFSA Journal* [en ligne]. 2010. Vol. 8, n° 2. DOI 10.2903/j.efsa.2010.1499. Disponible à l'adresse : <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2010.1499>

GILLES, J., DAVID, J.-F., DUVALLET, G., DE LA ROCQUE, S. et TILLARD, E., 2007. Efficiency of traps for *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger niger* on Reunion Island. *Medical and Veterinary Entomology*. 2007. Vol. 21, n° 1, pp. 65-69. DOI 10.1111/j.1365-2915.2006.00658.x.

GRISEZ, C., BOTTARI, L., PRÉVOT, F., ALZIEU, J-P, LIÉNARD, E., CORBIÈRE, F., RAMEIL, M., DESCLAUX, X., LACZ, C., BOULON, C., PETERMANN, J., LE MÉVEL, J., VILARDELL, C. et JACQUIET, P., 2020. Real-time PCR on skin biopsies for super-spreaders' detection in bovine besnoitiosis. *Parasites & Vectors*. 2020. Vol. 13, n° 1, pp. 529. DOI 10.1186/s13071-020-04405-7.

HUO, Y., LI, M., AN, Z., SUN, J., MEI, Q., WEI, B., QIU, Z., XIE, J. et HE, M., 2021. Ozonolysis of Permethrin in the Atmosphere: Mechanism, Kinetics, and Evaluation of Toxicity. *The Journal of Physical Chemistry. A*. 2021. Vol. 125, n° 35, pp. 7705-7715. DOI 10.1021/acs.jpca.1c04812.

JACQUIET, P., LIÉNARD, E. et FRANC, M., 2010. Bovine besnoitiosis: Epidemiological and clinical aspects. *Veterinary Parasitology*. 2010. Vol. 174, n° 1-2, pp. 30-36. DOI 10.1016/j.vetpar.2010.08.013.

LANGENMAYER, M. C., GOLLNICK, N. S., SCHARR, J. C., SCHARES, G., HERRMANN, D. C., MAJZOUB-ALTWECK, M. et HERMANN, W., 2015. Besnoitia

besnoiti infection in cattle and mice: ultrastructural pathology in acute and chronic besnoitiosis. *Parasitology Research*. 2015. Vol. 114, n° 3, pp. 955-963. DOI 10.1007/s00436-014-4261-6.

MIHOK, S., KANG'ETHE, E. K. et KAMAU, G. K., 1995. Trials of Traps and Attractants for *Stomoxys* spp. (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*. 1995. Vol. 32, n° 3, pp. 283-289. DOI 10.1093/jmedent/32.3.283.

MIQUEL, L., 2023. *Développement de nouveaux pièges pour la lutte contre les mouches hématophages*. Thèse d'exercice Médecine vétérinaire. Université Toulouse 3 Paul Sabatier.

MÜLLER, J., MANSER, V. et HEMPHILL, A., 2019. In vitro treatment of *Besnoitia besnoiti* with the naphtho-quinone buparvaquone results in marked inhibition of tachyzoite proliferation, mitochondrial alterations and rapid adaptation of tachyzoites to increased drug concentrations. *Parasitology*. 2019. Vol. 146, n° 1, pp. 112-120. DOI 10.1017/S0031182018000975.

PICKENS, L.G., SCHMIDTMANN, E.T. et MILLER, R.W., 1994. How to control house and stable flies without using pesticides. 1994. Vol. Agriculture Information Bulletin, n° 673.

PITZER, J. B., KAUFMAN, P. E. et TENBROECK, S. H., 2010. Assessing Permethrin Resistance in the Stable Fly (Diptera: Muscidae) in Florida by Using Laboratory Selections and Field Evaluations. *Journal of Economic Entomology*. 2010. Vol. 103, n° 6, pp. 2258-2263. DOI 10.1603/EC10166.

ROCHON, K, HOGSETTE, J A, KAUFMAN, P E, OLAFSON, P U, SWIGER, S L et TAYLOR, D B, 2021. Stable Fly (Diptera: Muscidae). Biology, Management, and Research Needs. *Journal of Integrated Pest Management*. 2021. Vol. 12, n° 1, pp. 38. DOI 10.1093/jipm/pmab029.

SHARIF, S., JACQUIET, P., PREVOT, F., GRISEZ, C., RAYMOND-LETRON, I., SEMIN, M. O., GEFFRÉ, A., TRUMEL, C., FRANC, M., BOUHSIRA, É. et LIÉNARD, E., 2019a. *Stomoxys calcitrans*, mechanical vector of virulent *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle to susceptible rabbit. *Medical and Veterinary Entomology*. 2019. Vol. 33, n° 2, pp. 247-255. DOI 10.1111/mve.12356.

SHARIF, S., JACQUIET, P., PREVOT, F., GRISEZ, C., RAYMOND-LETRON, I., SEMIN, M. O., GEFFRÉ, A., TRUMEL, C., FRANC, M., BOUHSIRA, É. et LIÉNARD, E., 2019b. *Stomoxys calcitrans*, mechanical vector of virulent *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle to susceptible rabbit. *Medical and Veterinary Entomology*. 2019. Vol. 33, n° 2, pp. 247-255. DOI 10.1111/mve.12356.

SHARIF, S., JACQUIET, P., PRÉVOT, F., GRISEZ, C., BOUHSIRA, E., FRANC, M. et LIENARD, E., 2017. Assessment of persistence of *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) bradyzoites in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2017. Vol. 168, n° 7-9, pp. 197.

TAINCHUM, K., SHUKRI, S., DUVALLET, G., ETIENNE, L. et JACQUIET, P., 2018. Phenotypic susceptibility to pyrethroids and organophosphate of wild *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) populations in southwestern France. *Parasitology Research*. 2018. Vol. 117, n° 12, pp. 4027-4032. DOI 10.1007/s00436-018-6109-y.

VANDERWAAL, K. L. et EZENWA, V. O., 2016. Heterogeneity in pathogen transmission: mechanisms and methodology. HAWLEY, Dana (éd.), *Functional Ecology*. 2016. Vol. 30, n° 10, pp. 1606-1622. DOI 10.1111/1365-2435.12645.

Conclusion générale

La besnoitiose bovine est une maladie parasitaire affectant les élevages bovins, avec des retombées économiques importantes. Elle est causée par un protozoaire *Besnoitia besnoiti*, véhiculé par la mouche hématophage *Stomoxys calcitrans*. Les travaux auxquels j'ai contribué pendant ma thèse d'exercice s'inscrivent dans une démarche de lutte contre cette maladie. Trois axes centraux pour cette lutte ont été abordés.

Le premier axe touche à une meilleure connaissance de *S. calcitrans*, vecteur principal de la besnoitiose bovine. Mes travaux (parties 3 et 4 de ce mémoire) abordent dans ce contexte les questions des variations saisonnières de cet insecte, leur distance de propagation à partir d'un foyer infectieux, ainsi que la distance sur laquelle le pathogène *B. Besnoiti* peut être identifié sur le vecteur.

L'étude rétrospective sur 3 années (partie 3) de données de captures de pièges dans cinq élevages du Gers permet de confirmer une périodicité annuelle bi-phasique des populations de stomoxes. Une première émergence précède la période estivale lorsque les températures commencent à augmenter, et la seconde apparaît suite au redoux de l'automne, souvent associée à une augmentation de la pluviométrie. Cette étude révèle également des variations interannuelles et inter-sites importantes, rendant difficiles les approches expérimentales qui s'appuient sur la comparaison entre sites et d'une année sur l'autre.

La surveillance sur site de la dynamique des populations de *S. calcitrans* (partie 4) permet de proposer que les stomoxes rayonnent à une distance pouvant atteindre une soixantaine de mètres, et que la distance de propagation du pathogène *B. besnoiti* par *S. calcitrans* peut atteindre une distance similaire. Ces observations confirment la pertinence des recommandations actuelles de conduite d'élevage préconisant de séparer géographiquement les lots infectés des lots sains d'un minimum de 100 mètres et idéalement d'une distance supérieure à 300 mètres.

Le second axe concerne l'étude et la mise au point de pièges à mouches hématophages expérimentaux nouveaux, plus abordables et plus respectueux de l'environnement que le piège de référence Vavoua. Les résultats décrits dans la partie 2 de ce mémoire indiquent que si les spécificités des pièges expérimentaux sont voisines de celle du piège Vavoua, leur sensibilité l'est moins. Il sera donc nécessaire

d'apporter des modifications à ces prototypes, lesquelles seront guidées par la comparaison des performances des pièges expérimentaux entre eux. Dans ce contexte, il a été observé une efficacité de capture et une spécificité plus importante des modèles P23d+ et P35 en comparaison au modèle P33.

Le troisième axe porte sur le dépistage de *B. besnoiti* chez *S. calcitrans*, vecteur du pathogène. Avant notre étude, ce dépistage avait déjà été réalisé par détection de l'ADN du parasite *B. besnoiti* en conditions de laboratoire sur des stomoxes d'élevage directement exposés à du sang artificiellement infecté. Les résultats obtenus par PCR en temps réel lors de notre étude en élevage montrent que cette approche est transposable à des conditions de terrains. Des améliorations dans la phase analytique des données de PCR et/ou dans la conservation des insectes sont néanmoins nécessaires pour augmenter la performance de cette approche de dépistage.

Annexes

Annexe 1 : Résultats des PCR quantitative sur peaux positives dans les élevages A et B

Élevage A

Individu	Valeurs de Ct
Bovin 1	18,08
Bovin 2	21,68
Bovin 3	33,21
Bovin 4	20,31

Élevage B

Individu	Valeurs de Ct
Bovin 1	35,46
Bovin 2	25,93
Bovin 3	23,61
Bovin 4	27,39
Bovin 5	26,84
Bovin 6	22,72

Annexe 2 : Description des lots et données des PCR en temps réel de l'élevage A

Date	Condition de conservation	Position	Nature de l'échantillon	Nombre de stomoxes	PCR ADN Bovin	PCR ADN de <i>B. besnoiti</i>
23/05/2023	Eau savonneuse	L0	sang	1	34,55	No Ct
			abdomen	10	33,99	No Ct
30/05/2023		L0	abdomen	1	36,8	No Ct
			abdomen	1	29,75	No Ct
			sang	1	27,07	No Ct
			abdomen	1	28,32	No Ct
			abdomen	1	26,27	No Ct
06/06/2023		L0	sang	5	28	No Ct
			sang	3	34,49	No Ct
			sang	5	29,89	31,72
	sang		3	33,22	No Ct	
	sang		4	26,21	No Ct	
13/06/2023	Alcool dilué à 50%	L0	abdomen	1	33,26	No Ct
			abdomen	1	No Ct	No Ct
			abdomen	1	29,61	No Ct

		abdomen	1	34,31	36,77
		abdomen	1	36,95	No Ct
		abdomen	10	No Ct	No Ct
		abdomen	10	34,67	No Ct
		abdomen	10	37,5	30,8
20/06/2023	L0	abdomen	10	30,98	No Ct
		abdomen	10	29,63	No Ct
		abdomen	10	30,06	No Ct
	L1	abdomen	10	32,65	No Ct
		abdomen	10	27,8	No Ct
		abdomen	10	28,34	No Ct
	L3	abdomen	10	26,92	No Ct
abdomen		10	25,88	No Ct	
27/06/2023	L0	abdomen	10	No Ct	No Ct
	L1	abdomen	10	36,64	No Ct
	L2	abdomen	10	No Ct	No Ct
		abdomen	10	No Ct	No Ct
	L3	abdomen	10	28,29	No Ct
		abdomen	10	25,88	No Ct
07/07/2023	L0	abdomen	10	36,94	No Ct
		abdomen	10	No Ct	No Ct
	L1	abdomen	10	No Ct	No Ct
	L2	abdomen	10	No Ct	No Ct
		abdomen	10	37,99	No Ct
	L3	abdomen	10	No Ct	No Ct
abdomen		10	No Ct	No Ct	

Annexe 3 : Protocole d'amplification du kit ADIAVET™ BESNOITIA REAL TIME

VI. Amplification

a- Déterminer le nombre d'échantillons à analyser, y compris les témoins utilisés (par exemple les témoins positif et négatif d'extraction, le témoin positif d'amplification (« Positive control ») et le témoin réactif d'amplification (NTC)).

b- Décongeler le réactif « A5 » à température ambiante. Bien homogénéiser. Répartir 20 µl dans chacun des tubes PCR ou des puits de la plaque PCR avec une pipette munie de pointes Nuclease-free.

c- Remplacer immédiatement le tube « A5 » à <-15°C et à l'obscurité.

d- Pour chaque échantillon, le témoin négatif d'extraction (obligatoire) et le témoin positif d'extraction (recommandé), ajouter 5 µl d'extrait purifié aux 20 µl de réactif « A5 ».

Pour le témoin positif, ajouter 5 µl de la solution (§ II.3.) aux 20 µl de réactif « A5 ».

Pour le témoin réactif d'amplification (NTC), ne rien ajouter au réactif « A5 ».

Remplacer immédiatement les extraits d'ADN purifiés à +2/8°C ou <-15°C. Éliminer les bulles qui pourraient rester au fond des puits.

e- Démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le cycler.

La cible *Besnoitia besnoiti* est lue en FAM. Le contrôle interne est lu en VIC ou HEX. Le Quencher est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive ROX pour les appareils ABI. La lecture de la fluorescence s'effectue pendant l'étape d'élongation (1 minute à 60°C).

Le programme suivant a été développé pour les appareils ABI Prism (type 7500, Step-one...) d'Applied Biosystems (cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe), pour le Rotorgene de Qiagen et pour le Chromo 4 de Biorad :

2 minutes à 50°C

10 minutes à 95°C

15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C pendant 45 cycles

Le programme ci-dessous concerne les MX3000P et MX3005P de Stratagène :

2 minutes à 50°C

10 minutes à 95°C

30 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C pendant 45 cycles

Roche diagnostic : LightCycler 2*, LightCycler 480*

* NOTE : L'utilisation de thermocycleurs LightCycler nécessite au préalable une manipulation de calibration. Nous fournissons la procédure et les réactifs nécessaires à cette calibration.

Contactez-nous si vous souhaitez utiliser d'autres appareils.

Annexe 4 : Résultats des moyennes de densité apparente par piège (DAP) dans l'élevage B

Site	Piège	DAP moyenne
L0	Vavoua	41,32
	P23	21,83
L1	Vavoua	3,63
	P23	0,81
L2	Vavoua	2,34
	P23	0,335
L3	Vavoua	4,24
	P23	0,86
L4	Vavoua	31,92

Moyenne réalisée sur l'ensemble des captures entre le 17/04/2024 et le 08/07/2024.

Annexe 5 : Description des lots et données des PCR en temps réel de l'élevage B

Date	Position	Nombre de stomoxes par lot	PCR ADN Bovin	PCR ADN <i>B. besnoiti</i>
27/03/2024	L0	10	33,79	No Ct
		10	43,43	No Ct
03/04/2024	L0	10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
	L4	1	No Ct	No Ct
11/04/2024	L0	10	36,07	No Ct
	L3	10	33,61	38,91
	L4	7	33,46	No Ct
17/04/2024	L0	10	25,97	No Ct
		10	28,94	No Ct
	L1	1	No Ct	No Ct
	L4	10	42,35	No Ct
23/04/2024	L0	10	No Ct	No Ct
		10	33,59	No Ct
30/04/2024	L0	10	No Ct	No Ct
		9	35,68	No Ct
	L1	1	No Ct	No Ct
	L2	1	No Ct	No Ct
07/05/2024	L-1	1	No Ct	No Ct
	L0	10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	43,9
	L1	2	No Ct	No Ct
	L2	5	No Ct	39,67
	L3	10	No Ct	No Ct
L4	5	No Ct	No Ct	
15/05/2024	L-1	7	No Ct	No Ct
	L0	10	No Ct	37,7
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	38,48
	L1	2	No Ct	38,06
	L2	10	No Ct	No Ct
	L3	4	No Ct	No Ct
L4	10	No Ct	No Ct	
27/05/2024	L-1	10	31,35	38,11
	L0	10	36,76	No Ct
		10	No Ct	No Ct

	L1	10	No Ct	No Ct
	L2	10	No Ct	43,18
	L3	10	No Ct	No Ct
	L4	10	No Ct	No Ct
05/06/2024	L-1	10	29,94	41,16
	L0	10	44,77	42,92
		10	No Ct	37,6
		10	34,49	No Ct
		10	No Ct	37,54
	L2	10	No Ct	38,41
	L3	10	No Ct	No Ct
	L4	10	No Ct	No Ct
13/06/2024	L-1	10	32,27	38,31
		8	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	33,56	No Ct
	L0	10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
	L1	10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
	L2	10	No Ct	40,39
	L2	8	No Ct	No Ct
	L3	10	No Ct	No Ct
	L4	10	No Ct	No Ct
L4	10	No Ct	No Ct	
18/06/2024	L-1	10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	40,31
		10	No Ct	No Ct
	L0	10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	35,75	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
L1	10	No Ct	No Ct	
	10	35,96	No Ct	

		10	No Ct	No Ct	
		10	38,55	40,58	
	L2	10	No Ct	No Ct	
		5	No Ct	No Ct	
	L3	10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
	L4	10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
25/06/2024	L-1	10	32,06	No Ct	
		10	40,5	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
	L0	10	No Ct	No Ct	
		10	35,4	No Ct	
		10	32,59	No Ct	
		10	35,13	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
		L1	10	36,17	No Ct
			10	No Ct	No Ct
	10		No Ct	No Ct	
	L2	10	38,07	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
	L3	10	36,14	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
	L4	10	No Ct	No Ct	
10		No Ct	No Ct		
03/07/2024	L0	10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
		10	No Ct	No Ct	
09/07/2024	L-1	10	29,46	No Ct	
		10	30,02	No Ct	

		10	29,68	No Ct
		10	30,81	No Ct
	LO	10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	31,94	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct
		10	No Ct	No Ct

NOM : GRABA

PRENOM : LEÏLA

TITRE : Évaluation de nouveaux pièges à mouches hématophages et de leur utilité dans l'étude et le contrôle des stomoxes et de la besnoitiose bovine

RÉSUMÉ : La besnoitiose bovine est une maladie parasitaire ré-émergente causée par *Besnoitia besnoiti*, un protozoaire parasite transmis par des mouches hématophages comme *Stomoxys calcitrans*. L'objectif de cette étude est d'améliorer les méthodes de lutte contre cette maladie afin de réduire sa propagation. Les travaux expérimentaux sur plusieurs élevages bovins portent sur l'évaluation de l'efficacité de nouveaux pièges à mouches hématophages, ainsi que sur l'approfondissement des connaissances concernant le vecteur *S. calcitrans*. Les résultats indiquent des différences significatives de l'efficacité des pièges, qui se distinguent par leur sensibilité et leur spécificité à capturer les mouches vectrices, et ouvrent des perspectives quant à leur amélioration ; des distances de propagation du vecteur supérieur à celles précédemment établies ; et la faisabilité d'un dépistage de l'ADN de *B. besnoiti* chez *S. calcitrans* par PCR en temps réel en condition de terrain.

MOTS CLES : besnoitiose bovine ; *Stomoxys calcitrans* ; Pièges ; mouches hématophages ; *Besnoitia besnoiti*

TITLE: Evaluation of new haematophagous fly traps and their use in studying and controlling stable flies and bovine besnoitiosis

ABSTRACT: Bovine besnoitiosis is a re-emerging parasitic disease caused by *Besnoitia besnoiti*, a parasitic protozoan transmitted by haematophagous flies such as *Stomoxys calcitrans*. The aim of this study is to improve control methods for this disease in order to reduce its spread. Experimental work on a number of cattle farms focused on evaluating the effectiveness of new traps for haematophagous flies, as well as increasing our knowledge of the *S. calcitrans* vector. The results show significant differences in the effectiveness of the traps, which are distinguished by their sensitivity and specificity in capturing vector flies, and open up prospects for their improvement; greater vector propagation distances than previously established; and the feasibility of screening for *B. besnoiti* DNA in *S. calcitrans* by real-time PCR under field conditions.

KEY WORDS: bovine besnoitiosis ; *Stomoxys calcitrans* ; traps ; haematophagous fly ; *Besnoitia besnoiti*