

---

# LA CALCIFICATION TESTICULAIRE CHEZ LES BOUCS DE CENTRES D'INSEMINATION ARTIFICIELLE : ETUDE CLINIQUE ET REPERCUSSION SUR LA PRODUCTION DE SEMENCE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2002  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Julie GUILLOT**  
Née, le 13 janvier 1976 à PARIS (75)

---

Directeur de thèse : Madame le Docteur Nicole HAGEN-PICARD

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Jean PARINAUD**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**Mme Nicole HAGEN-PICARD**  
**Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :  
**M. Bernard LEBOEUF**

Ingénieur de recherches INRA



## **A notre président de thèse**

**Monsieur le Professeur Jean Parinaud**

Professeur des universités

Praticien hospitalier

*Biologie du développement et de la reproduction*

Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse  
Hommages respectueux.

## **A notre jury de thèse**

**Madame le Docteur Nicole Hagen-Picard**

Maître de conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie de la reproduction*

Qui nous a confié cette étude captivante  
Qu'elle veuille bien accepter mes sincères remerciements pour sa totale  
disponibilité et son investissement sans faille.

**Madame le Docteur Isabelle Raymond-Letron**

Maître de conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Anatomie pathologique*

Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de toute ma gratitude pour sa  
collaboration à cette étude et pour sa participation à notre jury de thèse.

**Monsieur Bernard Leboeuf**

Ingénieur de recherche INRA

et à l'ensemble de l'équipe de la station INRA-Rouillé et du laboratoire de  
physiologie de la reproduction et des comportements, INRA-Nouzilly

Qu'ils veuillent accepter tous mes remerciements pour leur accueil  
chaleureux et leur soutien précieux tout au long de cette étude.



## **A nos collaborateurs**

**Monsieur le Professeur Francis Enjalbert**  
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Alimentation*

et le laboratoire d'alimentation de l'ENVT

**Monsieur Pascal Boué**  
Directeur de CAPRI-IA

et à l'ensemble du personnel du centre d'insémination artificielle  
CAPRI-IA

Qu'ils veuillent bien recevoir l'expression de ma reconnaissance  
pour avoir permis cette étude et pour leur aide durant les manipulations.

## **A mes proches**

### **Ma famille**

Qui me soutient et m'encourage dans toutes mes entreprises

Papounet qui est toujours au bout du téléphone en cas de besoin  
Mamounette qui a toujours le bon conseil et le mot qui console

Merci

### **Mes amis**

Eve, Eglantine, depuis toujours  
Emilie, Agnès, Marion, Corinne, Luc, et les autres...

Soyez assurés de mon amitié et de ma présence à vos cotés  
dans tous les moments forts de votre vie.



MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	<b>P. DESNOYERS</b>
Directeurs honoraires.....	: M.	<b>R. FLORIO</b>
	M.	<b>R. LAUTIE</b>
	M.	<b>J. FERNEY</b>
	M.	<b>G. VAN HAVERBEKE</b>
Professeurs honoraires.....	: M.	<b>A. BRIZARD</b>
	M.	<b>L. FALIU</b>
	M.	<b>C. LABIE</b>
	M.	<b>C. PAVAU</b>
	M.	<b>F. LESCURE</b>
	M.	<b>A. RICO</b>
	M.	<b>A. CAZIEUX</b>
	Mme	<b>V. BURGAT</b>
	M.	<b>D. GRIESS</b>

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2<sup>e</sup> CLASSE**

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

**PROFESSEURS ASSOCIE**

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*
- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

## PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

## MAITRES DE CONFERENCES 1<sup>ère</sup> CLASSE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
Mme **BRET-BENNIS Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
Mme **RAYMOND-LETRON Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

## MAITRES DE CONFERENCES 2<sup>e</sup> CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mme **COLLARD-MEYNAUD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*  
Mlle **HAY Magali**, *Zootechne*  
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*  
M. **GRANDJEAN Christophe**, *Gestion de la santé en élevage des ruminants*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENTS ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **MEYNADIER-TROEGELER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

**La calcification testiculaire chez le bouc  
de centres d'insémination artificielle :**  
étude clinique et répercussion  
sur la production de semence.

## **SOMMAIRE**

# 1. Table des matières

<b>SOMMAIRE</b> -----	<b>9</b>
1. TABLE DES MATIÈRES.....	10
2. INDEX DES ILLUSTRATIONS .....	13
<i>a. Les figures</i> .....	13
<i>b. Les tableaux</i> .....	13
<i>c. Les photographies</i> .....	14
<b>INTRODUCTION</b> -----	<b>15</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : La reproduction chez le bouc d'insémination artificielle</b> -----	<b>17</b>
<b>A- ANATOMIE DE L'APPAREIL GÉNITAL DU BOUC</b> -----	<b>18</b>
1. LES TESTICULES ET ENVELOPPES TESTICULAIRES .....	18
2. LES VOIES SPERMATIQUES EXTRATESTICULAIRES .....	21
3. LES GLANDES ANNEXES.....	22
<b>B- PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LE MÂLE</b> -----	<b>23</b>
1. LA SPERMATOGENÈSE .....	23
<i>a. Spermatogenèse</i> .....	23
<i>b. Méiose</i> .....	23
<i>c. Spermiogenèse</i> .....	24
2. RÉGULATION HORMONALE DE LA FONCTION SEXUELLE .....	25
3. ASPECTS SPÉCIFIQUES DE LA REPRODUCTION CHEZ LE BOUC. ....	28
<i>a. Puberté</i> .....	28
<i>b. Saisonnalité</i> .....	29
<b>C- L'INSÉMINATION ARTIFICIELLE CAPRINE</b> -----	<b>31</b>
1. INTÉRÊTS DE L'INSÉMINATION ARTIFICIELLE .....	31
<i>a. Désaisonnement</i> .....	31
<i>b. Intérêt sanitaire</i> .....	32
<i>c. Amélioration génétique</i> .....	33
2. CONDUITE DES MÂLES .....	35
3. PRODUCTION DE SEMENCE .....	37
<i>a. Collecte</i> .....	37
<i>b. Conditionnement de la semence</i> .....	37
<i>c. Cryoconservation de la semence</i> .....	39
<b>D- PATHOLOGIES DE L'APPAREIL GÉNITAL DU BOUC</b> -----	<b>40</b>
1. PATHOLOGIES CONGÉNITALES.....	41
<i>a. Anomalies chromosomiques</i> .....	41
<i>b. Anomalies de développement</i> .....	43
2- PATHOLOGIES ACQUISES .....	44
<i>a. Anomalies des voies spermatiques, du pénis et du prépuce</i> .....	44
<i>b. Anomalies des testicules et de l'épididyme</i> .....	45
<i>c. Anomalies des glandes annexes</i> .....	47
3- DÉGÉNÉRESCENCE ET CALCIFICATION TESTICULAIRE .....	48
<i>a. Définition</i> .....	48
<i>b. Etiologie</i> .....	49
<i>c. Diagnostic, pronostic et traitement</i> .....	52

<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>55</b>
<b>A- LES ANIMAUX</b>	<b>56</b>
1. PRÉSENTATION	56
2. CONDUITE DES ANIMAUX	56
3. CRITÈRES D'EXCLUSION DE L'ÉTUDE	57
<b>B. MESURES EFFECTUÉES SUR LES BOUCS</b>	<b>58</b>
1. <i>IN VIVO</i>	58
a. <i>Volume testiculaire</i>	58
b. <i>Examen échographique</i>	58
c. <i>Etude de la zincémie</i>	63
2. ANATOMOPATHOLOGIE DU TESTICULE	63
a. <i>Observation macroscopique</i>	63
b. <i>Analyse histologique</i>	64
<b>C- EXAMEN SÉMINOLOGIQUE</b>	<b>67</b>
1. EVALUATION QUANTITATIVE DES ÉJACULATS FRAIS	67
2. EVALUATION QUALITATIVE DES ÉJACULATS CONGELÉS	67
3. ANOMALIES SPERMATIQUES	68
<b>D- ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS</b>	<b>70</b>
1. PARAMÈTRES ÉTUDIÉS	70
a. <i>Production de semence</i>	70
b. <i>Examen échographique</i>	71
2. ANALYSES STATISTIQUES	71
<b>RÉSULTATS</b>	<b>75</b>
<b>A- ETUDE DES LÉSIONS TESTICULAIRES</b>	<b>76</b>
1. EXAMEN ÉCHOGRAPHIQUE	76
2. VOLUME TESTICULAIRE	78
3. ÉTUDE HISTOLOGIQUE DES TESTICULES	79
a. <i>Description des lésions macroscopiques</i>	79
b. <i>Description des lésions histologiques</i>	80
c. <i>Résultats semi-quantitatifs</i>	83
<b>B- ETUDE ÉTIOPATHOLOGIQUE</b>	<b>85</b>
1. ORIGINE ALIMENTAIRE	85
a. <i>Rationnement</i>	85
b. <i>Zincémie</i>	86
2. ORIGINE HÉRÉDITAIRE	88
<b>C- ETUDE DES RÉPERCUSSIONS SUR LA PRODUCTION DE SEMENCE</b>	<b>89</b>
1. PARAMÈTRES SÉMINOLOGIQUES	89
2. ANOMALIES MORPHOLOGIQUES DES SPERMATOZOÏDES	91
<b>DISCUSSION</b>	<b>93</b>
<b>A- ETUDE DES LÉSIONS TESTICULAIRES</b>	<b>94</b>
1. EXAMEN ÉCHOGRAPHIQUE	94
2. VOLUME TESTICULAIRE	96
3. HISTOLOGIE	97

<b>B-ETIOPATHOLOGIE DE LA CALCIFICATION TESTICULAIRE</b> -----	<b>98</b>
1. CARENCE EN ZINC .....	98
2. INFLUENCE GÉNÉTIQUE .....	100
<b>C- RÉPERCUSSIONS SUR LA PRODUCTION DE SEMENCE</b> -----	<b>101</b>
1. PARAMÈTRES SÉMINOLOGIQUES.....	101
2. ANOMALIES SPERMATIQUES.....	102
 <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> -----	 <b>103</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE</b> -----	 <b>105</b>
 <b>ANNEXES</b> -----	 <b>109</b>
1. PRÉPARATION D'UNE SOLUTION DE FORMOL TAMPONNÉ À 10% .....	109
2. COLORATION À L'HÉMALUN-ÉOSINE.....	110
3. COLORATION AU TRICHROME DE MASSON.....	111
4. COLORATION DE VON KOSSA.....	113

## 2. Index des illustrations

### a. Les figures

1- Appareil uro-génital isolé et étalé du bouc-----	20
2- Etape de méiose de la spermatogenèse-----	24
3- Schéma récapitulatif de la spermatogenèse-----	25
4- Régulation hormonale de la fonction de reproduction chez le mâle-----	27
5- Variation saisonnière du volume et de la concentration en spermatozoïdes-----	30
6- Evolution mensuelle de la collecte et du prix moyen du lait de chèvre-----	32
7- Etapes du schéma de sélection des mâles de la filière caprine-----	35
8- Intérêts du traitement photopériodique sur la production de semence de boucs-----	36
9- Anomalie chromosomique : le chimérisme-----	42
10- Représentation schématique de la réalisation d'une échographie testiculaire-----	59
11- Répartition des boucs dans chaque classe d'âge-----	71
12- Répartition des boucs dans chaque groupe d'atteinte testiculaire-----	76
13- Evolution de la répartition des notes échographiques en fonction des examens-----	77
14- Volume du testicule droit en fonction de l'âge des animaux-----	78
15- Comparaison des lésions histologiques et des atteintes testiculaires à l'échographie-----	84
16- Augmentation des zincémies, 45j après administration de zinc en fonction des zincémies (ln) avant traitement-----	87

### b. Les tableaux

1- Prévalence des pathologies testiculaires chez 2281 béliers en Australie-----	40
2- Prévalence des pathologies testiculaires chez 1000 boucs en Australie-----	41
3- Echelle semi-quantitative d'évaluation de la calcification testiculaire-----	59
4- Poids des testicules de 10 boucs après abattage-----	64
5- Echelle de notation de la motilité individuelle des spermatozoïdes-----	68
6- Répartition des boucs en fonction de l'atteinte testiculaire et de la race-----	77
7- Répartition des boucs en fonction de l'atteinte testiculaire et de l'âge-----	78
8- Moyenne ( $\pm$ ET) des volumes testiculaires en fonction de l'atteinte testiculaire-----	79
9- Description quantitative des lésions histologiques-----	84
10- Analyse de la ration alimentaire distribuée en 2001-2002 aux boucs de Capri-IA-----	85

11- Analyse de la ration alimentaire distribuée en 2001-2002 aux boucs de l'INRA-SEIA--	85
12- Concentrations plasmatiques en zinc en fonction de l'atteinte testiculaire-----	86
13- Nombre de pères en fonction du pourcentage de fils présentant des lésions testiculaires-	88
14- Nombre de grands-pères en fonction du pourcentage de petits-fils présentant des lésions testiculaires-----	88
15- Paramètres séminologiques en fonction de l'atteinte testiculaire à l'échographie-----	89
16- Paramètres séminologiques en fonction de la race-----	89
17- Paramètres séminologiques en fonction de la série-----	90
18- Paramètres séminologiques en fonction de l'âge à la mise à la reproduction-----	90
19- Pourcentage de spermatozoïdes normaux, d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes vivants et pourcentage de spermatozoïdes morts, normaux ou anormaux, en fonction de l'atteinte testiculaire-----	91

### **c. Les photographies**

1- Image échographique d'un testicule sain-----	60
2- Image échographique d'un testicule noté 1 : quelques foyers hyperéchogènes de petite taille-----	60
3- Image échographique d'un testicule noté 2 : quelques foyers hyperéchogènes de grande taille-----	61
4- Image échographique d'un testicule noté 2 : nombreux foyers hyperéchogènes de petite taille-----	61
5- Image échographique d'un testicule noté 3 : nombreux foyers hyperéchogènes de petite et grande taille-----	62
6- Image échographique d'un testicule noté 4 : très nombreux foyers hyperéchogènes de petite et grande taille répartis sur l'ensemble du testicule-----	62
7- Coupe longitudinale de testicule de bouc présentant des calcifications testiculaires-----	80
8- Coupes histologiques de tubes séminifères sains et présentant une stase spermatique-----	81
9- Coupe histologique de tubes séminifères présentant une stase spermatique et des calcifications-----	81
10- Coupe histologique présentant une association de lésions principales (hypoplasie et calcification) et de lésions secondaires (fibrose)-----	82
11- Coupe histologique présentant une dégénérescence testiculaire-----	83

## **INTRODUCTION**

En France, le cheptel caprin a une vocation essentiellement laitière. L'insémination artificielle a été développée dans les années 1980 chez la chèvre laitière avec deux principaux objectifs, d'une part l'optimisation du schéma de sélection dans les deux races laitières, l'Alpine et la Saanen, et d'autre part, une meilleure maîtrise de la reproduction.

Deux centres de production de semence existent en élevage caprin : CAPRI-IA et l'INRA-SEIA. Ils sélectionnent les mâles destinés à l'insémination artificielle sur leur qualité génétique et sur leur aptitude à produire une semence de qualité. Il est donc primordial de surveiller attentivement les animaux : tout problème affectant la capacité des boucs à se reproduire peut, en effet, avoir des conséquences sur l'ensemble du cheptel via la grande diffusion de leurs gènes par l'intermédiaire de l'insémination artificielle.

Dans les deux centres d'insémination artificielle caprins, des lésions de calcification testiculaire ont été observées par échographie chez 20 à 30% des animaux ces dernières années. Cette pathologie apparaît chez des jeunes boucs (1 an environ), lors de leur première saison sexuelle. Ces lésions pourraient être à l'origine d'une diminution de la production de semence et entraîner des pertes économiques sur les mâles de haute valeur génétique. Par ailleurs, ces reproducteurs sont utilisés très largement dans la population caprine et il est important d'évaluer le caractère héréditaire de cette pathologie.

Les données bibliographiques [Ahmad et al. 1993, Ahmad et Noakes 1995] rapportent des calcifications testiculaires chez des animaux plus âgés. Leur origine est mal connue: elle pourrait être liée à un déséquilibre minéral, en particulier à un déficit en zinc [Ahmad et Noakes 1995].

Compte tenu de l'importance de la calcification testiculaire dans les deux centres d'insémination français (fréquence élevée, atteinte d'animaux jeunes et de haute valeur génétique), nous nous proposons de caractériser cette affection chez les boucs de centres d'insémination, d'examiner les répercussions sur la production de semence et d'étudier l'origine alimentaire et/ou génétique de cette pathologie.

Avant de développer cette étude expérimentale, nous présenterons des données bibliographiques concernant l'anatomie de l'appareil génital du bouc, la physiologie et la pathologie de la reproduction et la production de semence caprine en France. Cette partie a pour but de situer notre problématique sur la calcification testiculaire chez les boucs de centres d'insémination, qui sera développée dans la partie expérimentale selon un plan classique, matériels et méthodes, résultats et discussion.

**La calcification testiculaire chez le bouc  
de centres d'insémination artificielle :**  
étude clinique et répercussion  
sur la production de semence.

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE :**

La reproduction chez le bouc d'insémination artificielle

## **A- ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL DU BOUC**

Les fonctions de l'appareil reproducteur mâle sont : (1) la production, la nutrition et le stockage des gamètes, les spermatozoïdes, (2) l'émission et le dépôt dans les voies génitales femelles, lors de l'accouplement, de la semence et (3) la synthèse d'hormones sexuelles. Le tractus génital mâle comprend:

- deux gonades ou testicules qui élaborent les gamètes et sécrètent des androgènes
- les voies spermatiques qui assurent la maturation des spermatozoïdes et leur acheminement dans les voies génitales femelles
- les glandes annexes qui produisent le liquide séminal nécessaire à la survie des spermatozoïdes par un apport d'éléments nutritifs et leur transport dans un milieu liquide (figure 1).

### **1. Les testicules et enveloppes testiculaires**

Les testicules sont situés en dehors de la cavité abdominale, en position sous-inguinale. Ainsi leur température est inférieure de 3 à 5°C à celle du corps, condition nécessaire au déroulement normal de la spermatogenèse [Bonnes et al. 1988]. Chez les ruminants, les testicules sont dits pendulaires car ils sont de forme ovale et en position verticale. Chez le bouc adulte, le testicule mesure en moyenne 7.5 à 11.5cm de haut et de 3.8 à 6.8cm de large et varient en fonction de la saison sexuelle. La circonférence scrotale, correspondant à la mesure du diamètre maximal, est de 28 à 30cm [Mickelsen et Memon 1997].

Les fonctions des enveloppes testiculaires sont de soutenir et de protéger les testicules, ainsi que d'assurer la thermorégulation de la glande. On retrouve de l'extérieur vers l'intérieur: le scrotum (peau et muscle dartos), un fascia fibreux, une tunique vaginale et l'albuginée, ainsi qu'un muscle releveur du testicule, le cremaster. Il intervient dans la thermorégulation en contrôlant la position du testicule par rapport à l'abdomen.

Le cordon testiculaire relie le testicule à la cavité abdominale: il est constitué du canal déférent pour le transit des spermatozoïdes et du cône vasculaire qui assure la vascularisation et l'innervation du testicule. Le plexus pampiniforme est un réseau d'anastomoses veineuses qui assurent le refroidissement du sang artériel.

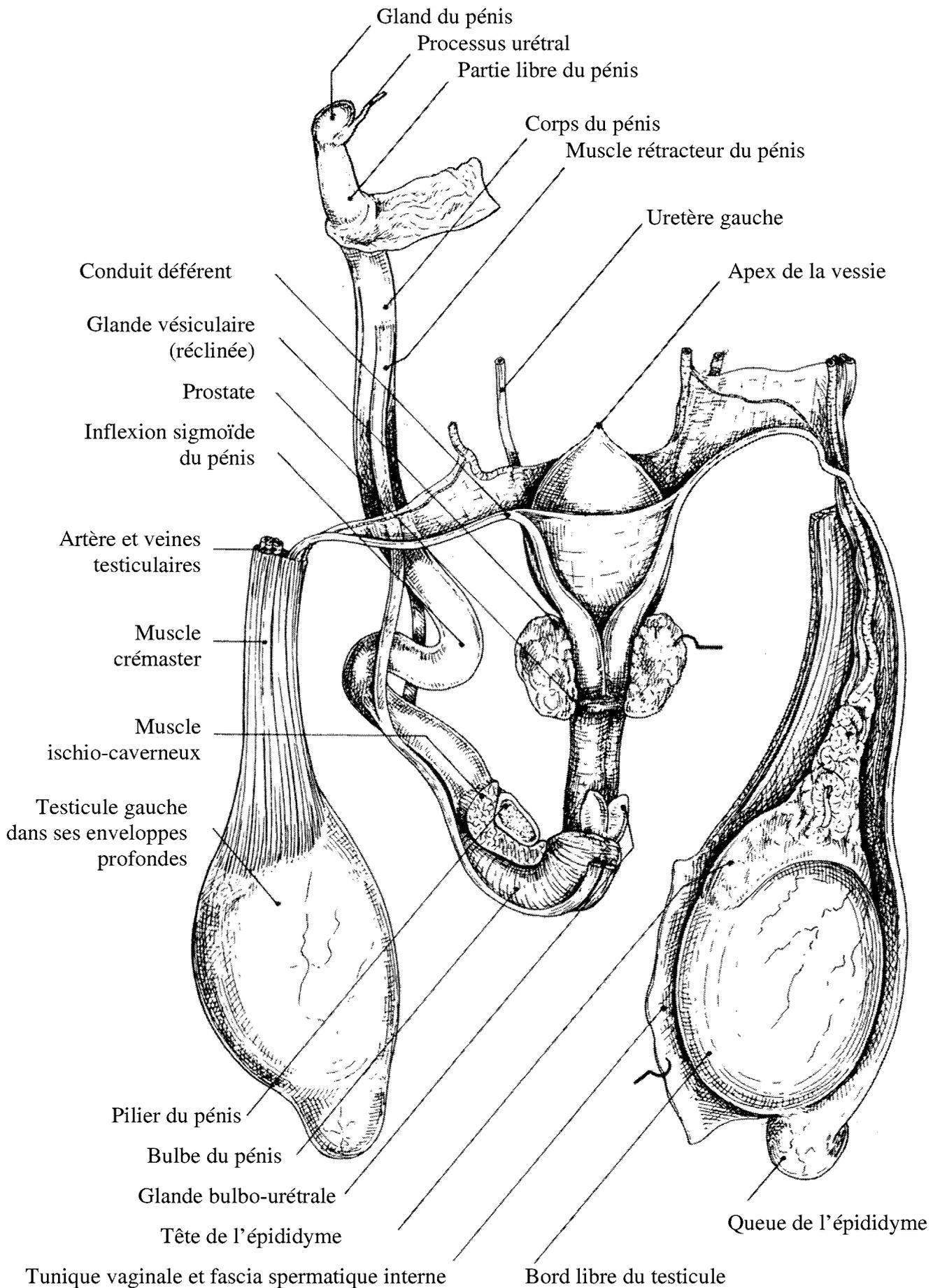


Figure 1 : Appareil uro-génital isolé et étalé du bouc [d'après Chatelain 1987]

Le testicule est divisé en plusieurs centaines de lobules à l'intérieur desquels les tubes séminifères sont pelotonnés. Les tubes séminifères sont constitués d'une lame basale et d'un épithélium séminal. En coupe, on observe, en périphérie de l'épithélium séminal, les noyaux des cellules de Sertoli dont le cytoplasme soutient et nourrit les cellules germinales. Les spermatogonies se différencient, en spermatocytes I et II puis en spermatides et finalement en spermatozoïdes, en migrant vers la lumière du tube séminifère. Les tubes séminifères sont entourés d'un fin tissu conjonctif où se trouvent les capillaires sanguins et lymphatiques, les nerfs ainsi que des amas de cellules de Leydig [Stevens et Lowe 1993].

A la sortie d'un lobule, les tubes séminifères contournés deviennent des tubes droits courts qui se réunissent en un réseau de canalicules anastomosés pour former le rete-testis. Ils se poursuivent par les canalicules efférents testiculaires (16 à 19 tubules chez le bouc). Leurs parties extratesticulaires, pelotonnées sur elles mêmes, forment des cônes dont l'ensemble constitue la tête de l'épididyme [Bonnes et al. 1988, Hemeida et al. 1978].

## **2. Les voies spermatiques extratesticulaires**

L'épididyme est un organe allongé, plaqué le long du testicule, composé de trois parties: la tête, le corps et la queue. Elle est formée d'un très long système canaliculaire pelotonné qui débute par les canalicules efférents qui se réunissent au niveau du corps de l'épididyme pour donner un conduit unique le conduit épидидymaire. Il peut mesurer jusqu'à 60 mètres chez le verrat, le bélier et le bouc [Barone 1978]. L'épididyme assure le stockage, le transport vers les organes éjaculateurs, et la maturation (acquisition de la mobilité et de la fécondance) des spermatozoïdes.

L'épididyme se poursuit par le conduit déférent qui transporte les spermatozoïdes jusque dans la cavité abdominale où il se jette dans l'urètre au niveau de la face dorsale de la vessie. La partie distale du canal déférent est élargie pour donner l'ampoule, de 6-7cm de long sur 4-5mm de diamètre, chez le bouc [Barone 1978].

L'urètre est un organe impair qui sert à la fois à l'excrétion du sperme et de l'urine. Il se divise en trois parties: l'urètre pelvien dans le bassin, le bulbe de l'urètre au niveau de

l'inflexion sigmoïde et l'urètre pénien. Chez les petits ruminants, il se termine par un processus urétral à l'extrémité du pénis, de 3 à 5cm de long chez le bouc [Barone 1978].

Le pénis, organe de l'accouplement, permet de déposer la semence dans les voies génitales femelles, au moment de la saillie. Il est formé de l'urètre pénien, des muscles ischiocaverneux et de formations érectiles (corps spongieux et caverneux) qui se dilatent sous l'afflux de sang au moment de l'érection.

### **3. Les glandes annexes**

Les glandes annexes sont au nombre de trois: les vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbourétrales. La prostate a la particularité d'être constituée uniquement d'une partie disséminée dans la paroi de l'urètre chez le bouc. Les sécrétions des glandes annexes participent à la formation du plasma séminal. Leur rôle majeur est l'apport de substrats énergétiques aux spermatozoïdes ainsi que leur dilution en milieu liquide ce qui favorise leur mobilité et leur transfert dans les voies génitales femelles. Plusieurs études ont montré que les sécrétions n'étaient pas indispensables à l'acquisition de la fécondance par les spermatozoïdes chez le bouc, c'est pourquoi dans le cadre de l'insémination artificielle, le plasma séminal peut être éliminé sans diminution de la fertilité des spermatozoïdes, à condition d'apporter des éléments nutritifs exogènes [Corteel 1974].

## **B- PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LE MALE**

### **1. La spermatogenèse**

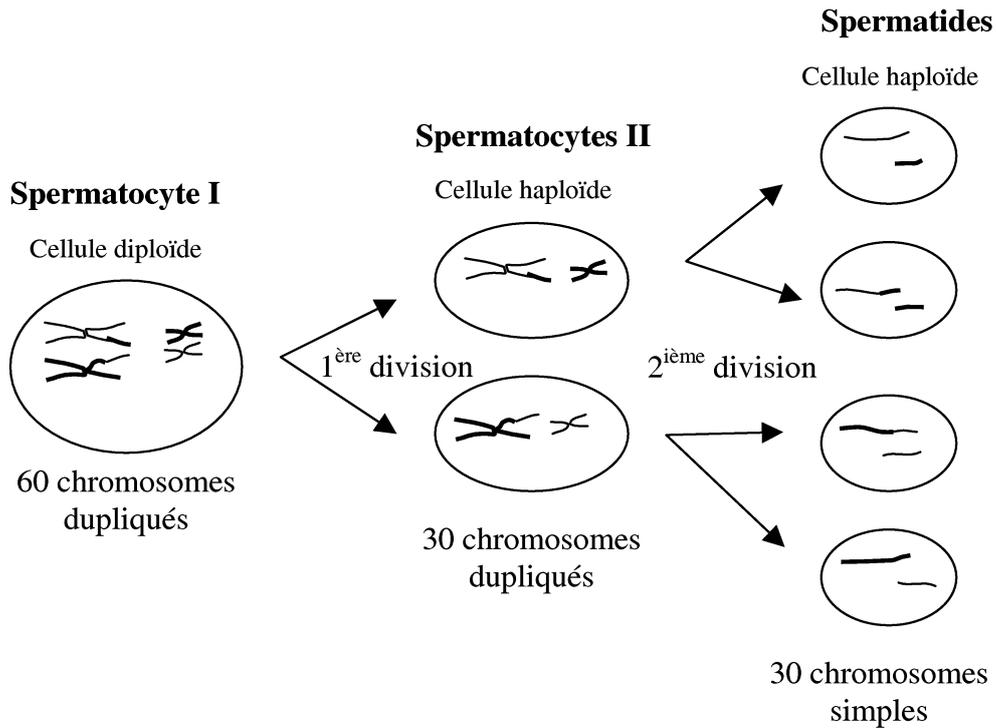
Les spermatozoïdes sont produits dans les tubes séminifères dans le parenchyme testiculaire. La production spermatique comprend plusieurs étapes des cellules souches aux spermatozoïdes (figure 3).

#### **a. Spermatogenèse**

La spermatogenèse proprement dite est l'étape de prolifération des cellules souches (spermatogonies) par mitose pour conserver un stock constant de cellules, jusqu'à leur différenciation en spermatides. Les spermatogonies sont disposées en périphérie de l'épithélium séminal et entre les cellules de Sertoli avec lesquelles elles ont un contact étroit. Régulièrement, des spermatogonies rentrent en phase de différenciation pour donner des spermatocytes de premier ordre (spermatocytes I).

#### **b. Méiose**

Les spermatocytes I répliquent leur ADN avant de rentrer en méiose. C'est au cours de cette étape que le phénomène de crossing-over se produit, permettant l'échange de portions de chromosomes entre les chromosomes homologues paternels et maternels (figure 2). Cela concourt au brassage des gènes caractéristique de la reproduction sexuée. La première division de méiose réduit le nombre de chromosomes et donne des spermatocytes de deuxième ordre (spermatocytes II). Ils subissent rapidement la deuxième division de méiose qui séparent les deux chromatides de chaque chromosome pour donner des cellules haploïdes: les spermatides.



**Figure 2** : Etape de méiose de la spermatogenèse : répartition des chromosomes au cours de la division de méiose. Les chromosomes d'origine paternels et maternels peuvent échanger des portions de chromosomes au cours des crossing-over.

### c. Spermiogenèse

La spermiogenèse est l'étape de différenciation cytoplasmique : les spermatozoïdes se transforment en spermatozoïdes avec de nombreuses modifications structurales et chimiques. On distingue quatre phases: la phase de golgi, du capuchon, de l'acrosome et de maturation. Les vésicules golgiennes fusionnent et se concentrent sur la partie antérieure du noyau pour donner l'acrosome. Les centrioles s'orientent à l'opposé de l'acrosome pour donner naissance au flagelle. Les mitochondries se disposent en anneau autour des filaments du flagelle tandis que le cytoplasme résiduel est phagocyté par les cellules de Sertoli sous forme d'une gouttelette cytoplasmique [Derivaux et Ectors 1985].

Chez le bouc, la durée du cycle spermatogénétique est estimée à 50.7jours: 36.9jours pour la spermatogenèse et 13.8jours pour la spermiogenèse [Derashri et al. 1992].

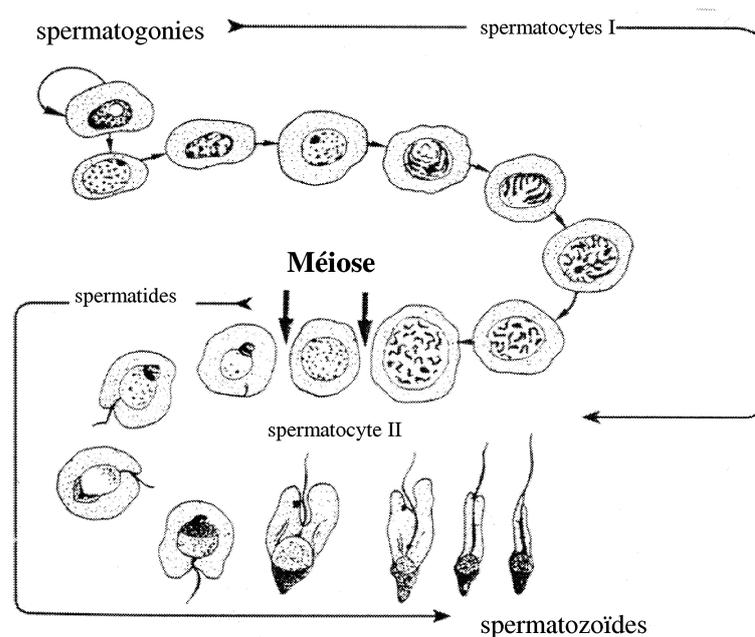


Figure 3 : Schéma récapitulatif de la spermatogenèse : évolution des cellules de la lignée germinale mâle, exemple de l'homme (d'après Dadoune JP. et al 2001)

## 2. Régulation hormonale de la fonction sexuelle

Les principales hormones impliquées dans la régulation de la fonction sexuelle chez le bouc ont plusieurs origines : testiculaire, hypothalamo-hypophysaire et épiphysaire.

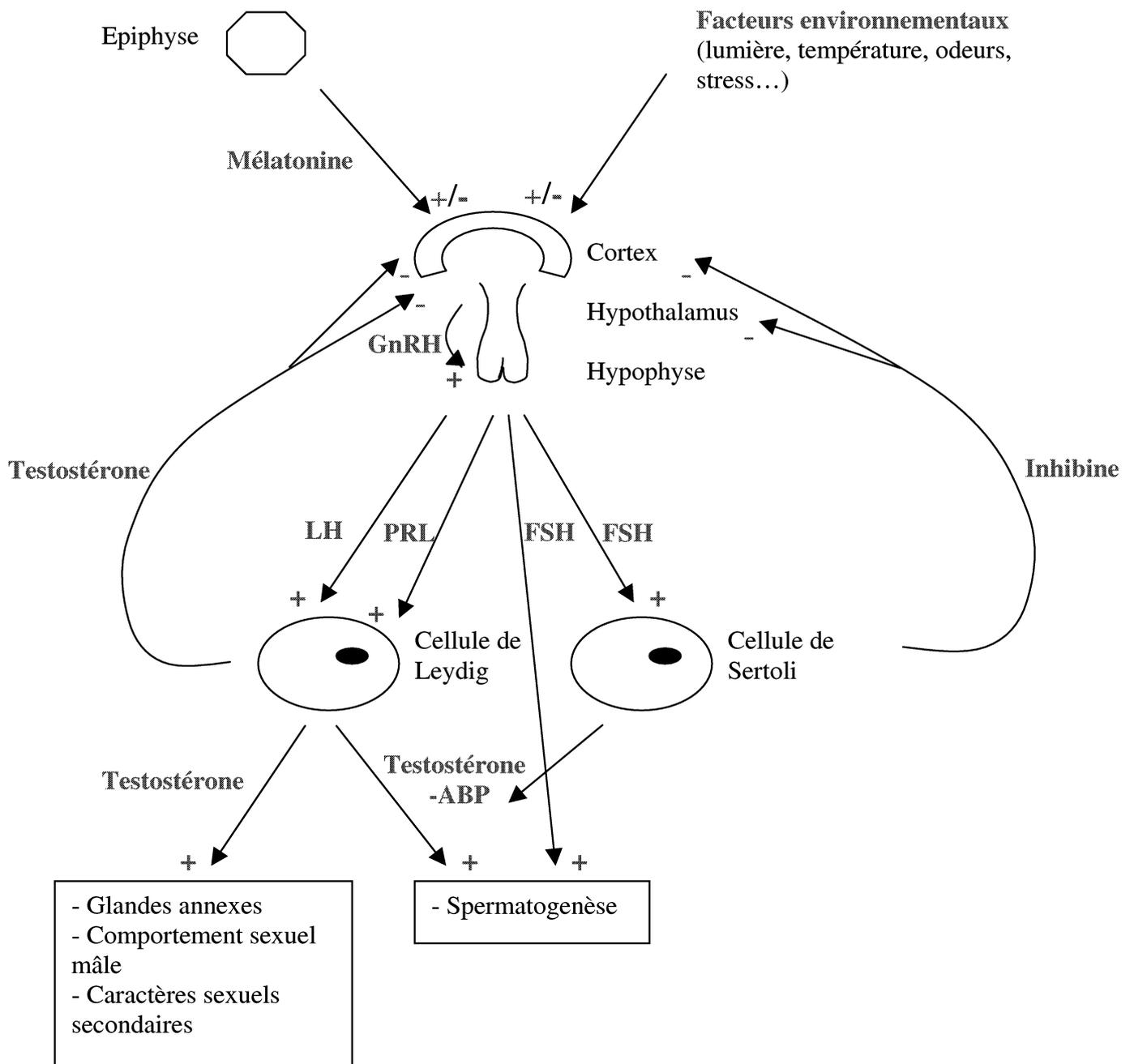
La testostérone est synthétisée par les cellules de Leydig. Elle contrôle les caractères sexuels spécifiques du mâle. La spermatogenèse, les sécrétions des glandes annexes et le comportement sexuel sont directement sous son influence. Elle régule également les caractères sexuels secondaires (développement musculaire, odeurs...).

Les cellules de Sertoli produisent l'inhibine et l'ABP (Androgen Binding Protein) qui se lie à la testostérone et la transporte vers l'épididyme. Le rôle de l'ABP n'est pas encore totalement élucidé.

La GnRH est produite par l'hypothalamus sous l'action des facteurs environnementaux, en particulier la photopériode. L'épiphyse synthétise et sécrète la mélatonine pendant les périodes d'obscurité. La sécrétion de mélatonine influe sur la libération de LH (stimulée en jours courts et inhibée en jours longs) [Chemineau et Delgadillo 1994]. La GnRH stimule la synthèse et la libération de FSH et de LH par l'hypophyse. Ces dernières agissent au niveau du testicule: FSH active la spermatogenèse et la production par les cellules de Sertoli, d'inhibine et d'ABP. LH stimule la synthèse d'androgènes par les cellules de Leydig [Derivaux et Ectors 1985]. L'antehypophyse, sous le contrôle de l'hypothalamus, produit la prolactine (PRL) qui exerce son action sur les cellules de Leydig en augmentant la synthèse de testostérone, en augmentant le nombre de récepteur à LH et en favorisant la fixation de LH sur ses récepteurs [Dadoune et Demoulin 2001].

De nombreuses autres hormones comme les hormones thyroïdiennes, surrénaliennes, pancréatiques interviennent aussi dans la régulation des fonctions testiculaires directement ou indirectement [Dadoune et Demoulin 2001].

Deux rétrocontrôles négatifs au niveau du cortex et de l'hypothalamus, via la testostérone et l'inhibine régulent la fonction sexuelle [Derivaux et Ectors 1985].



**Figure 4** : Régulation hormonale de la fonction de reproduction chez le mâle : LH, FSH et PRL sont produites par l'hypophyse, sous contrôle hypothalamique. Elles stimulent la fonction de reproduction en agissant sur les cellules testiculaires: cellules de Leydig et de Sertoli. Les hormones testiculaires, testostérone et inhibine, exercent un rétrocontrôle négatif sur le système nerveux central et l'hypophyse.

### **3. Aspects spécifiques de la reproduction chez le bouc.**

#### **a. Puberté**

La maturité sexuelle est définie comme la production des premiers éjaculats de bonne qualité. Elle est marquée par l'acquisition du comportement sexuel, l'augmentation des synthèses de testostérone et de LH, le début des sécrétions des glandes annexes, le démarrage de la spermatogenèse et finalement l'émission des premiers éjaculats. Parallèlement à ces modifications, les glandes annexes et les organes liés à la fonction sexuelle augmentent de taille.

Le suivi régulier des concentrations hormonales sur des chevreaux de race Alpine, montre une augmentation lente de la testostéronémie au cours des deux premiers mois de vie, puis une élévation importante corrélée à une augmentation rapide de la taille des testicules et du poids de l'animal, pendant les deux mois suivant. A quatre mois, la testéronémie est équivalente à celle mesurée chez des boucs adultes en saison sexuelle [Corteel 1994]. Parallèlement à ce processus, on assiste à une augmentation des concentrations plasmatiques de LH et de FSH.

Les premiers comportements sexuels du chevreau (flairage de la vulve, coup de patte, chevauchement...) apparaissent à des âges variables en fonction des races: de quelques jours après la naissance (races européennes) à plus d'un an après (race damasquine). Les premières saillies sont effectives à l'âge de 4-5 mois (races européennes) jusqu'à 15 mois (race damasquine) [Corteel 1994].

Entre 4 et 6 mois, Corteel [1994] a observé une augmentation rapide de la qualité et de la quantité du sperme de chevreaux alpins et poitevins. Cette étape marque le passage de l'état pubertaire (éjaculation des premiers spermatozoïdes) à la maturité sexuelle (production des premiers éjaculats de bonne qualité) permettant l'utilisation des animaux pour la reproduction.

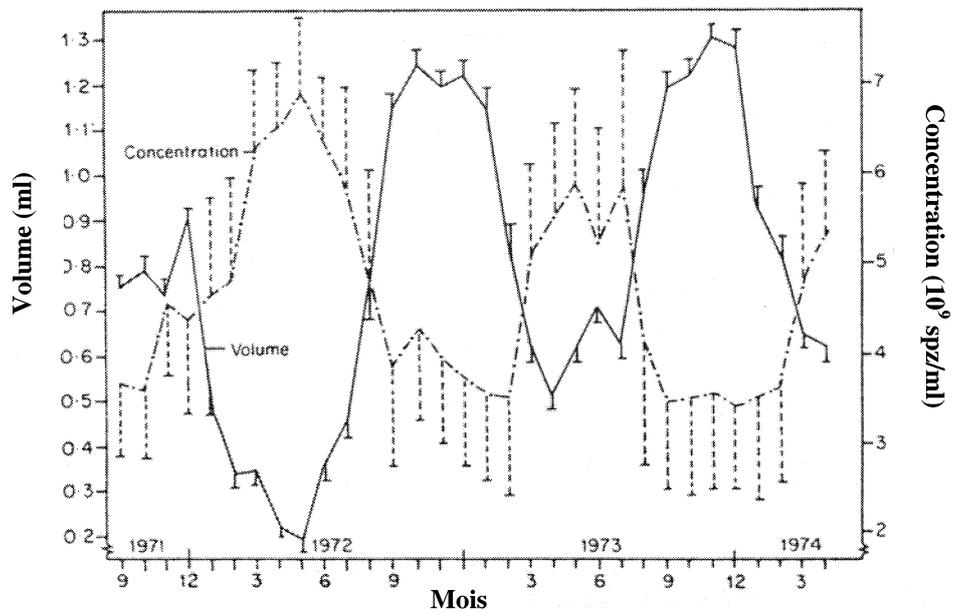
L'âge de la puberté varie en fonction de la saison de mises-bas. Les chevreaux nés au printemps ont une puberté plus précoce que ceux nés en automne, en relation avec la saison sexuelle.

## **b. Saisonnalité**

Sous nos latitudes, les caprins présentent une activité sexuelle saisonnée. La période de reproduction débute en été (juin), se poursuit en automne et jusqu'au début de l'hiver.

Chez les boucs de races européennes, le comportement sexuel, le volume testiculaire et la production de semence (volume et concentration) varient au cours de l'année sous l'influence de la photopériode (figure 5) [Corteel 1981]. La qualité des éjaculats est aussi affectée par la saison: le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et la motilité des spermatozoïdes sont plus élevés durant la saison sexuelle. Le nombre d'anomalies morphologiques varient également de 5-8% durant la saison sexuelle à 10-18% en contre-saison [Delgadillo Sanchez 1990].

Les variations saisonnières de l'activité sexuelle sont contrôlées par la durée de sécrétion de la mélatonine superposable à la durée de la nuit. Elle agit sur la sécrétion de GnRH et donc sur la fonction de reproduction. Un traitement photopériodique, avec une alternance de 2 mois de jours courts (8h de lumière) et 2 mois de jours longs (16h de lumière) permet de supprimer les variations saisonnières de l'activité sexuelle chez le mâle, bélier ou bouc [Delgadillo Sanchez 1990].



**Figure 5** : Variation saisonnière du volume (trait plein, ml) et de la concentration en spermatozoïdes (trait pointillé,  $\times 10^9$  spz/ml) (moyenne  $\pm$  écart-type) des éjaculats de 5 boucs poitevins, âgés de 8 mois au début des observations [d'après Corteel 1981]

## **C- L'INSEMINATION ARTIFICIELLE CAPRINE**

L'utilisation de l'insémination artificielle, largement utilisée dans l'élevage bovin reste encore limitée pour l'élevage caprin, malgré les avantages apportés par rapport à la monte naturelle. En France, l'insémination artificielle caprine ne s'est développée réellement qu'à partir de 1986, notamment en raison de la nécessité de mettre au point des techniques spécifiques de congélation de la semence de bouc et d'adapter aux chèvres les traitements de maîtrise des cycles mis au point chez les ovins. Elle concerne majoritairement deux races laitières; la race Alpine (61% des inséminations artificielles en 2000) et la race Saanen (39% des inséminations artificielles en 2000) [Capri-IA 2000]. L'insémination artificielle ne concerne cependant qu'une faible proportion (6-7%) de la population caprine française [Brice et al. 1997].

### **1. Intérêts de l'insémination artificielle**

#### **a. Désaisonnement**

En France, l'élevage caprin est orienté vers la production laitière, en vue principalement d'une transformation fromagère [Leboeuf et al. 1998a]. Les races françaises sont saisonnées : la lutte a lieu de septembre à novembre. La gestation durant environ 5 mois, les mises-bas ont lieu de février à avril. La lactation a une durée moyenne de 8 mois et demi conduisant à un tarissement d'octobre à janvier. La production laitière caprine est donc insuffisante durant l'automne et le début d'hiver.

Les transformateurs laitiers fixent un prix du lait plus élevé en automne-hiver pour encourager les éleveurs à produire du lait en contre-saison. Le désaisonnement de la reproduction des chèvres permet aux éleveurs d'adapter au mieux leur production laitière à la demande du marché (figure 6) [Leboeuf et al. 1998a].

Les traitements hormonaux des femelles à base de progestagènes, d'hormones gonadotropes et de mélatonine permettent à la fois de synchroniser les chèvres pour

l'insémination artificielle et d'avancer la période de mises-bas pour profiter d'une production laitière maximale en automne avec un prix du lait élevé. Les inséminations artificielles réalisées en avance de saison sexuelle sont possibles grâce à l'utilisation de semence congelée qui permet de féconder les femelles en dehors de la saison de collecte de semence (56% des IA ont été réalisées avant le 31 juillet pour l'année 2000 [Capri-IA 2000]) et aux traitements lumineux qui permettent de les collecter toute l'année.

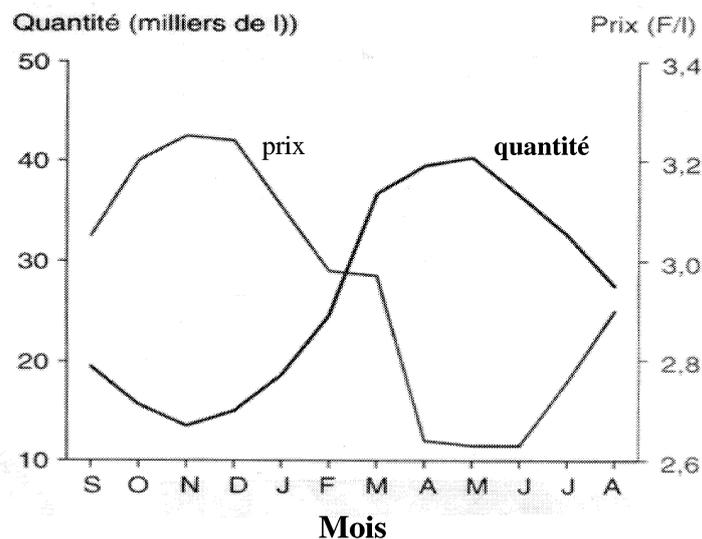


Figure 6 : Evolution mensuelle de la collecte (gras) et du prix moyen du lait de chèvre en 1996/1997 [d'après Leboeuf et al. 1998a]

### b. Intérêt sanitaire

L'insémination artificielle permet d'utiliser la semence d'un même bouc dans de nombreux élevages sans déplacement d'animaux. Il n'y a donc pas de risque de transmission d'agents pathogènes d'un élevage à l'autre.

La transmission d'agents pathogènes par le mâle en insémination artificielle est très limitée pour trois raisons:

- on évite la contamination directe d'un animal à l'autre car il n'y a pas de contact entre les individus.

- Le statut sanitaire du mâle est contrôlé à l'entrée en centre de production de semence et tout au long de sa carrière de reproducteur pour un grand nombre de maladies (brucellose, tuberculose, paratuberculose, fièvre Q, chlamydie). Ils sont en particulier contrôlés pour le CAEV (Arthrite Encéphalite Virale Caprine) pour éliminer de la reproduction les animaux porteurs. Annuellement, le laboratoire de contrôle des reproducteurs réalise un examen séminologique et recherche la présence éventuelle des différents agents pathogènes qui peuvent être transmis par la semence.
- Les conditions d'hygiène drastiques des laboratoires, l'addition d'antibiotique dans le dilueur limitent au maximum les risques de contamination au cours de la collecte et du conditionnement de la semence. De plus, les doses congelées subissent une quarantaine avant d'être commercialisées.

La quasi-certitude que l'animal reproducteur est indemne de maladie et que sa semence n'a pas pu être contaminée au cours des étapes de conditionnement permet d'assurer une qualité sanitaire exceptionnelle à la semence mise en place par les centres d'insémination artificielle.

### **c. Amélioration génétique**

La vocation principale du troupeau caprin français étant la production laitière, les paramètres de production choisis comme premiers critères de sélection sont : le taux protéique et la quantité de protéine par lactation. Seuls les animaux soumis au contrôle laitier et les élevages indemnes des principales maladies contagieuses servent de base à la sélection.

L'évaluation génétique des reproducteurs est réalisée par la méthode du modèle animal BLUP. Elle nécessite d'avoir des connexions entre les élevages (c'est à dire des descendants d'un même bouc dans plusieurs élevages afin de pouvoir les comparer) pour corriger un effet élevage éventuel. Cette évaluation génétique est possible grâce à l'utilisation de l'insémination artificielle qui permet d'avoir de nombreux descendants d'un même mâle dans différents élevages, au même moment [Leboeuf et al. 1998a].

La sélection des mères à boucs est réalisée dans l'ensemble des troupeaux qui adhèrent au contrôle laitier et qui ont au moins 20% de femelles issues d'insémination artificielle. Les meilleures productrices sur index sont accouplées avec les mâles sélectionnés comme pères à boucs. Les jeunes mâles, issus de ces accouplements programmés, sont génotypés pour le gène de la caséine alpha S1. Seuls les animaux porteurs d'un ou de deux allèles favorables pour la production fromagère feront partie du programme de sélection.

Les mâles choisis entrent alors en station de monte pour le prétestage. Il consiste en une évaluation de la capacité des jeunes boucs à éjaculer en présence de l'homme, dans le vagin artificiel et de la qualité de leur semence. En particulier, la résistance des spermatozoïdes à la congélation et à la décongélation est estimée. A la fin de ce prétestage, environ 50% des animaux sont éliminés en raison d'un comportement sexuel déficient ou d'une mauvaise résistance de la semence à la congélation-décongélation.

Les boucs sélectionnés sont alors testés sur descendance sur une quarantaine de filles dans au minimum 10 élevages différents. L'évaluation de leurs lactations permet d'avoir une bonne estimation de la valeur génétique des mâles. Les animaux collatéraux et les ascendants sont également pris en considération dans le calcul d'un index synthétique. Seuls les mâles améliorateurs sont conservés pour l'insémination artificielle, et les meilleurs d'entre eux seront choisis comme pères à boucs pour produire la génération suivante.

L'insémination artificielle permet de diffuser rapidement le progrès génétique du noyau de sélection vers les autres troupeaux laitiers et d'améliorer ainsi l'ensemble du cheptel français et même d'exporter la génétique vers d'autres pays. En effet, les chèvres issues d'insémination artificielle produisent + 89kg de lait, + 1.1g/kg de matière grasse et de + 0.4g/kg de matière protéique en plus, par rapport aux contemporaines [Leboeuf et al. 1998a].

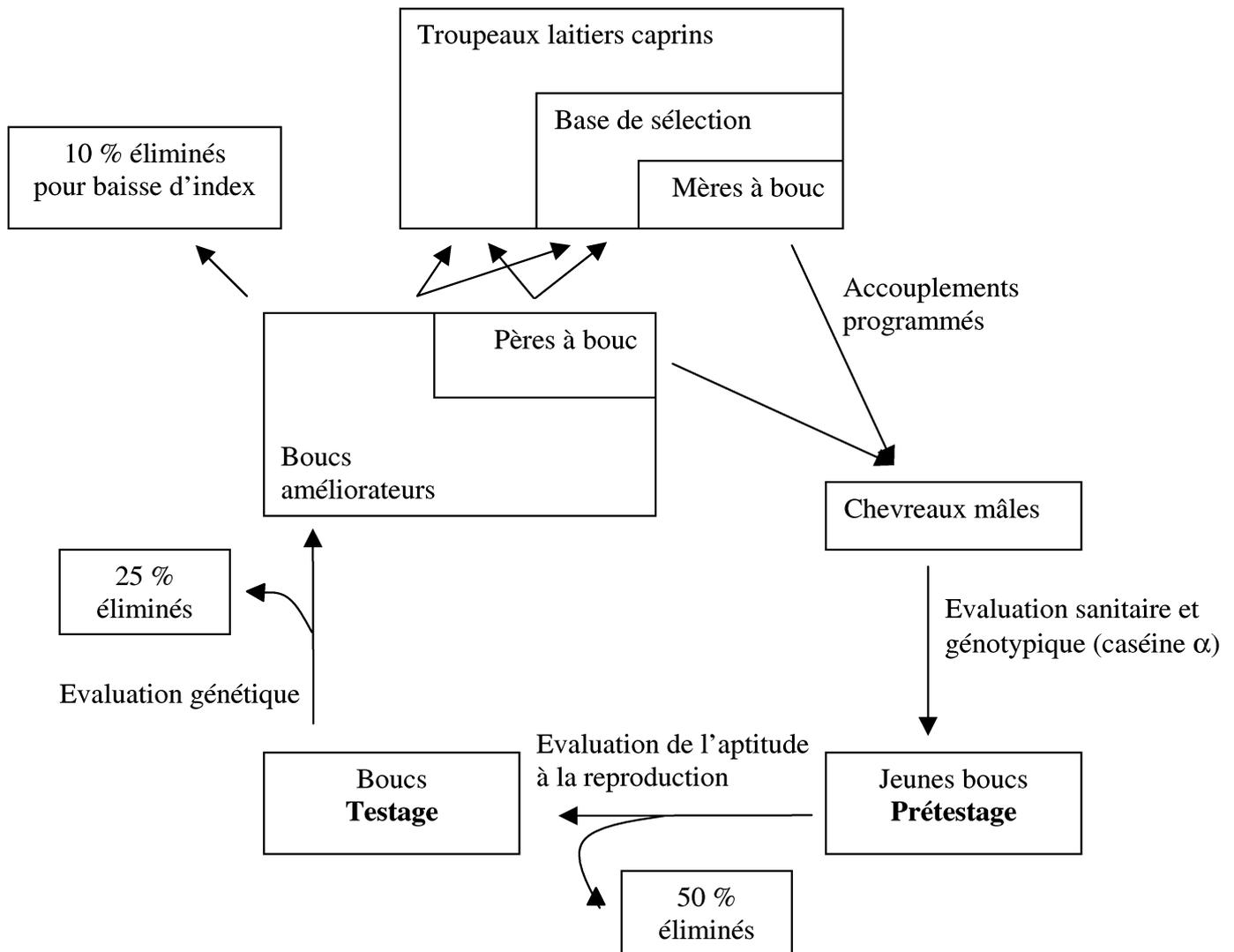


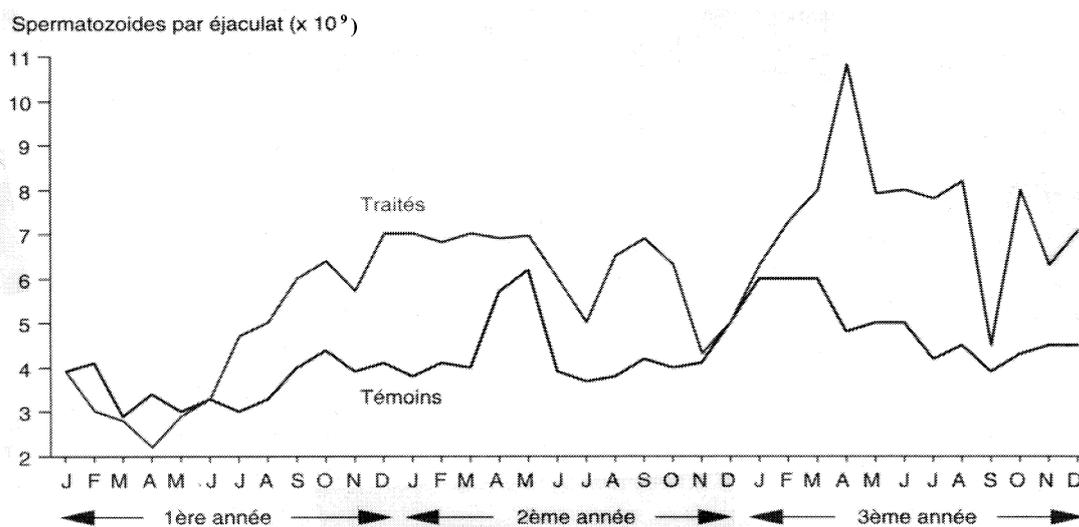
Figure 7 : Etapes du schéma de sélection des mâles de la filière caprine

## 2. Conduite des mâles

Le schéma génétique caprin impose une sélection rigoureuse des boucs destinés à l'insémination artificielle car leur semence sera diffusée à grande échelle. Ils doivent être aptes à produire une semence qui se congèle bien et transmettre des gènes améliorateurs de la production laitière. A la fin du prétestage et du testage, 25% seulement des mâles initialement choisis, deviendront des boucs d'insémination artificielle.

De plus, ils doivent être indemnes des maladies réputées légalement contagieuses (cf. paragraphes précédents).

Bien que les variations saisonnières soient moins marquées chez le mâle que chez la femelle, l'activité sexuelle saisonnée ne permet pas de récolter une semence de qualité toute l'année. Une diminution du volume et de la concentration de l'éjaculat s'accompagnant d'une baisse de la motilité est observée en dehors de la saison sexuelle [Refsal 1986, Corteel et al. 1978]. Afin de limiter les coûts économiques et d'augmenter le nombre de doses produites par an et par bouc, les mâles sont soumis à un traitement photopériodique qui consiste en une alternance de jours courts (8h de lumière et 16h d'obscurité) et de jours longs (16h de lumière et 8h d'obscurité). Ce traitement photopériodique supprime les variations saisonnières de l'activité sexuelle. Les boucs peuvent alors être collectés toute l'année. Des boucs soumis à ce traitement photopériodique pendant 3 ans et collectés deux fois par semaine ont produit 61% de spermatozoïdes totaux supplémentaires par rapport aux animaux témoins, avec une fertilité identique des femelles inséminées (figure 8). Une alternance (période de jours longs-période de jours courts) de deux mois semble plus favorable à la production spermatique qu'une alternance d'un mois (alternance de 1 mois :  $7 \pm 0.8 \cdot 10^9$  spz/éjaculat et 2 mois :  $7.4 \pm 0.6 \cdot 10^9$  spz/éjaculat [Delgadillo Sanchez 1990]).



**Figure 8 :** Intérêt du traitement photopériodique : Nombre total de spermatozoïdes par éjaculat chez des boucs Alpains et Saanen soumis à une alternance de 2 mois de jours courts (8h de lumière) et 2 mois de jours longs (16h de lumière) pendant 3 ans [d'après Leboeuf 98a]

### **3. Production de semence**

#### **a. Collecte**

La collecte de sperme est réalisée en présence d'une chèvre. Afin de stimuler le mâle, la femelle est maintenue en œstrus permanent à l'aide d'une injection de 100µg de benzoate d'œstradiol, une fois par semaine. Le sperme est collecté à l'aide d'un vagin artificiel, rempli d'eau à 55°C et conservé dans une étuve à 37°C afin que les spermatozoïdes ne subissent pas de choc thermique [Refsal 1986].

La fréquence des collectes habituellement appliquée dans les centres d'insémination est de deux fois par semaine. Une fréquence de cinq fois par semaine augmente la production hebdomadaire de spermatozoïdes (10.6 et 22.4 x 10<sup>9</sup> spz/semaine/animal, respectivement) [Corteel 1978]. Cependant, un intervalle de 2 ou 3 jours entre chaque collecte de sperme est préférable pour augmenter la survie des spermatozoïdes après congélation et décongélation [Boué et Corteel 1992].

#### **b. Conditionnement de la semence**

Le volume de l'éjaculat est estimé soit par lecture directe sur des tubes gradués soit par pesée. Le volume est en moyenne de 0.5 à 2ml chez le bouc avec une grande variabilité d'un éjaculat à l'autre et d'un mâle à l'autre [Refsal 1986].

La concentration est calculée par mesure de la densité optique par spectrophotométrie, après dilution d'un volume constant de semence pure dans une solution de NaCl à 9%, formolé à 0.1%. La densité optique est proportionnelle à la concentration en milliard de spermatozoïdes par ml. Elle varie, en moyenne, de 1.5 à 4 x 10<sup>9</sup> spz/ml chez le bouc [Refsal 1986].

Le plasma séminal du bouc présente la particularité de contenir une glycoprotéine lipase produite par les glandes bulbo-urétrales. Elle interagit avec les triglycérides du dilueur (à base de lait écrémé ou de jaune d'œuf) pour libérer des acides gras libres (acide oléique) toxiques pour les spermatozoïdes. L'addition directe du dilueur entraîne une diminution du

pourcentage de spermatozoïdes mobiles, une détérioration de la qualité des mouvements spermatiques, des anomalies de l'acrosome et une augmentation du nombre de spermatozoïdes morts. De plus, cette enzyme a une action directe sur les membranes cellulaires lésées (activité phospholipase A) qui augmenterait encore les dommages provoquées aux cellules et réduirait leur résistance à la congélation-décongélation [Pellicer-Rubio et Combarous 1998].

C'est pourquoi, le plasma séminal doit être éliminé le plus rapidement possible après la collecte. Pour cela, le sperme est lavé avec une solution de Krebs-Ringer-Phosphate-Glucose (KRPBG). Les spermatozoïdes sont séparés du plasma séminal par centrifugation, en éliminant le surnageant. Cette opération est répétée deux fois. Dans une étude sur la viabilité des spermatozoïdes de bouc au cours de la congélation, Corteel [1974] a montré que les paramètres séminologiques (pourcentage de spermatozoïdes mobiles et motilité), mesurés sur de la semence lavée sont supérieurs à ceux évalués sur de la semence non lavée.

Un dilueur à base de lait de vache écrémé reconstitué et glucosé est ajouté à environ 20°C. Il permet de mettre en suspension le culot de spermatozoïdes. Il apporte les éléments nutritifs nécessaires aux cellules ainsi que des antibiotiques (pénicilline, streptomycine) qui limitent le développement bactérien. Le volume de cette première dilution est ajusté pour obtenir une concentration de 1 milliard spz/ml.

Puis, la température de la semence est abaissée progressivement jusqu'à +4°C. Un pré-contrôle de la qualité des éjaculats (pourcentage de spermatozoïdes mobiles et motilité individuelle cf. infra) permet d'éliminer ceux de qualité insuffisante. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est évalué sur une goutte de semence diluée (concentration entre 60 et 80 x 10<sup>6</sup> spz/ml) au grossissement x200. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est estimé visuellement sur 5 champs d'observation. Il doit être supérieur à 30% pour que l'éjaculat soit conservé. Dans le même temps, la qualité des déplacements des spermatozoïdes est estimée en attribuant une note de motilité individuelle de 0 (aucun mouvement) à 5 (spermatozoïdes fléchants). Les éjaculats dont la note est inférieure à 3 ne sont pas conservés [Leboeuf et al. 1998a].

La concentration finale de 500 x 10<sup>6</sup> spz/ml est obtenue après une deuxième dilution, réalisée avec le même dilueur que précédemment, et glycérolé à 14%. Le glycérol est un

cryoprotecteur qui diminue les chocs osmotiques et mécaniques liés à la formation de gros cristaux à l'intérieur des cellules lors de la congélation. Il est ajouté en trois fois à dix minutes d'intervalle [Corteel 1974, Leboeuf et al. 1998b]. Un délai minimal d'une heure est respecté avant la congélation pour l'équilibration osmotique.

La semence diluée est conditionnée en paillettes type "Cassou" (IMV, L'Aigle 61) préimprimées de 0.2ml correspondant à  $100 \times 10^6$  spz/paillette. On obtient une moyenne de 35 paillettes par éjaculat pour un bouc adulte.

### **c. Cryoconservation de la semence**

La congélation se fait par diminution progressive de la température jusqu'à  $-196^{\circ}\text{C}$  dans les vapeurs d'azote liquide. Les paillettes sont ensuite immergées et stockées dans l'azote liquide [Leboeuf et al. 1998b, Leboeuf et al. 2000].

Une semaine environ après la collecte, un test de décongélation sur une paillette de chaque éjaculat permet d'évaluer la survie *in vitro* des spermatozoïdes. Pour cela, les paillettes sont immergées dans un bain à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 20 secondes. Les examens et les critères de conservation des éjaculats sont les mêmes que ceux réalisés après refroidissement à  $4^{\circ}\text{C}$ . En moyenne, 70% des éjaculats congelés sont conservés pour être utilisés en insémination artificielle [Leboeuf et al. 1998a].

## **D- PATHOLOGIES DE L'APPAREIL GENITAL DU BOUC**

Les boucs, destinés à la reproduction, sont régulièrement soumis à un examen clinique général pour vérifier leur état de santé. L'appareil reproducteur doit tout particulièrement être examiné pour détecter au plus tôt les pathologies responsables d'une diminution de la fertilité voire de stérilité. Les animaux atteints doivent être écartés de la reproduction et soignés le plus rapidement possible ou réformés. En outre, de nombreuses maladies infectieuses peuvent être transmises lors du coït ou via la semence, il est donc indispensable que seuls des animaux sains soient mis à la reproduction. Cette partie présente une revue bibliographique des pathologies de l'appareil génital du bouc. La dégénérescence testiculaire est développée plus particulièrement dans un paragraphe spécifique.

Les tableaux 1 et 2 présentent la fréquence des différentes pathologies testiculaires observées dans des abattoirs en Australie chez des béliers Mérinos et chez des boucs.

<b>Pathologies testiculaires</b>	<b>Béliers</b>
<b>Détectées par palpation</b>	
- atrophie / hypoplasie (moyenne à sévère)	112 (5%)
- cryptorchidie	92 (4%)
- épидидymite/ abcès scrotum	50 (2%)
- varicocèle	47 (2%)
<b>Détectées par dissection</b>	
- adhérences seules (modérées)	342 (15%)
- calcification	317 (13%)
- atrophie / hypoplasie (modérée)	202 (9%)
- kyste congénital épидидyme	136 (6%)
- Aplasie	1 (<1%)
- tumeur testiculaire	1 (<1%)

**Tableau 1** : Prévalence des pathologies testiculaires chez 2 281 béliers Mérinos, abattus dans 3 abattoirs de Perth, Australie. Nombre (%) [D'après Watt 1978].

<b>Pathologies</b>	<b>Boucs</b>
<b>Testicule</b>	
- adhérences	117 (11.7%)
- cryptorchidie	11 (1.1%)
- hypoplasie	3 (0.3%)
- hypoplasie focale des tubules séminifères	2 (0.2%)
- atrophie	3 (0.3%)
- minéralisation : sévère, diffuse	4 (0.4%)
modéré, focalisée	114 (11.4%)
- hernie parenchyme	1 (0.1%)
- abcès	1 (0.1%)
<b>Epididyme</b>	
- aplasie	1 (0.1%)
- granulome spermatique : tête	1 (0.1%)
corps	2 (0.2%)
- mélanome	2 (0.2%)

Tableau 2 : Prévalence des pathologies testiculaires chez 1000 boucs, abattus en Australie. Nombre (%) [D'après Tarigan et al. 1990].

## 1. Pathologies congénitales

Les pathologies d'origine congénitale doivent être diagnostiquées avant la mise à la reproduction pour écarter les animaux atteints et ne pas transmettre les gènes porteurs d'anomalies.

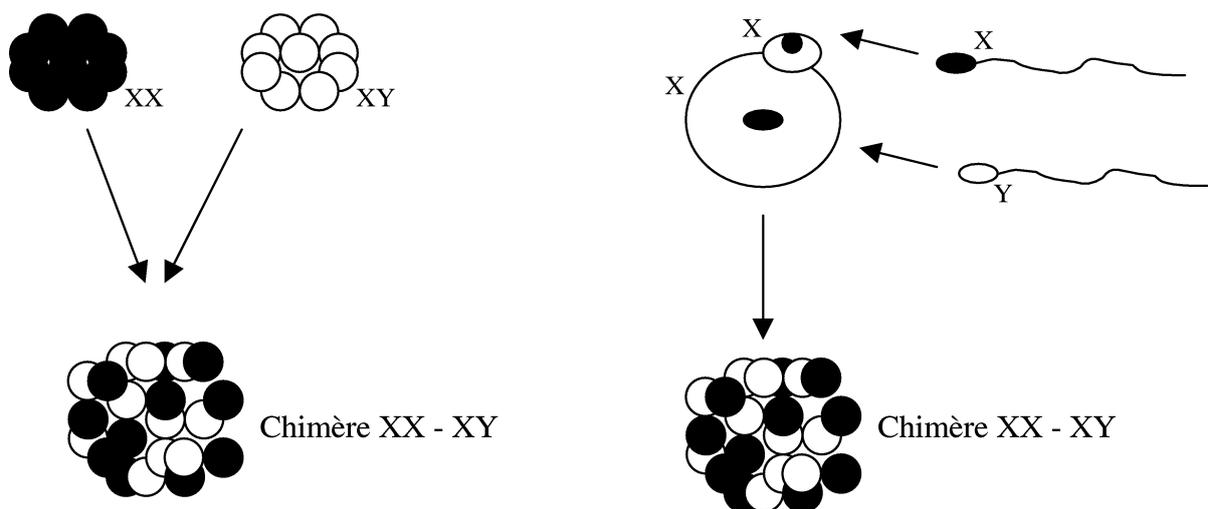
### a. Anomalies chromosomiques

Les **animaux intersexués ou hermaphrodites** sont, le plus souvent, génétiquement femelles (XX) mais présentent des phénotypes variés allant de la morphologie presque normale d'une femelle à celle d'un mâle avec de nombreux intermédiaires possibles [Mickelsen et Memon 1997]. On note souvent de nombreuses anomalies morphologiques, tels que : pénis plus court, hypospadias, hypoplasie testiculaire, cryptorchidie ou testicules inguinaux [Memon 1983]. La production spermatique est souvent défectueuse mais la synthèse de testostérone est normale permettant l'expression d'un comportement sexuel de mâle. Ces animaux sont naturellement dépourvus de cornes (gène motte). En effet, la sélection d'animaux sans corne a entraîné parallèlement la sélection d'un gène sur un locus

proche qui, malgré l'existence d'un génotype femelle, favorise le développement de caractères sexuels mâles. Ces animaux sont le plus souvent stériles.

Le **freemartinisme** est un chimérisme partiel (présence de cellules XX et de cellules XY dans le sang et les tissus hématopoïétiques) qui peut se produire lors d'une gestation gémellaire avec deux fœtus de sexe opposé. Des anastomoses sanguines entre les deux placentas permettent le mélange des sangs foetaux. L'animal atteint est stérile. La fréquence est plus faible chez les caprins que chez les bovins [Mickelsen et Memon 1997, Memon 1983]. Les anomalies morphologiques sont les mêmes que dans le cas d'animaux intersexués.

Les **chimères** résultent de la fusion précoce de deux embryons mâle et femelle ou de la fécondation du second globule polaire et de l'ovocyte par deux spermatozoïdes différents (X et Y) avant de fusionner ensemble pour donner un seul embryon (figure 9). Les animaux atteints présentent souvent les organes génitaux mâle et femelle ou des organes mixtes (ovotestis). Ils sont, bien entendu, non fonctionnels. Cette pathologie est rare chez les caprins (moins de 1% des animaux intersexués) [Mickelsen et Memon 1997].



**Figure 9** : Anomalies chromosomiques : le chimérisme (embryon avec des cellules mixtes XX et XY). Ils se forment suivant deux processus : fusion de deux embryons de sexe différent ou double fécondation de l'ovule et du second globule polaire par deux spermatozoïdes.

## **b. Anomalies de développement**

L'**hypoplasie testiculaire** est définie comme l'absence ou l'insuffisance de développement anatomique ou fonctionnel des testicules. Sa fréquence est de 14% chez les béliers et de 0.6% chez les boucs dans les études réalisées en Australie [Watt 1978, Tarigan et al. 1990]. Le plus souvent, l'hypoplasie testiculaire est la conséquence d'un état d'intersexualité mais, une malnutrition sévère ou une mutation génétique peuvent être également à l'origine de cette pathologie. Elle est souvent macroscopiquement indifférenciable d'une atrophie, à l'âge adulte, en l'absence de commémoratifs. On observe une réduction importante de la taille d'un ou des deux testicules. A l'histologie, les tubes séminifères sont de volume réduit, avec peu de cellules germinales et quelques cellules anormales multinucléées. Chez le bouc, cette pathologie est souvent associée à des anomalies morphologiques des voies spermatiques, inflexion sigmoïde et pénis [Derivaux et Ectors 1985].

La **monorchidie** (un seul testicule concerné) ou la **cryptorchidie** (les deux testicules) sont une absence de migration ou une migration anormale (ectopie) d'un ou des deux testicules au cours de leur descente de la cavité abdominale vers le scrotum. Sa fréquence est de 4% chez les béliers et de 1.1% chez les boucs en Australie [Watt 1978, Tarigan et al. 1990]. Chez les boucs de race Angora, cette anomalie présente un caractère héritable et récessif [Smith et Sherman 1994]. D'autres étiologies sont décrites comme un défaut de sécrétions hormonales, des adhérences fibreuses ou une infection sur le trajet du testicule lors de sa migration [Memon 1983]. Si les deux testicules sont atteints, l'animal est stérile. En effet, la température élevée dans la cavité abdominale (5°C au dessus de celle du scrotum) empêche le développement normal des tubes séminifères et le déroulement normal de la spermatogenèse. En revanche, la synthèse hormonale n'est pas perturbée et les animaux présentent des caractères sexuels secondaires mâles et une libido normale [Mickelsen et Memon 1997].

## 2- Pathologies acquises

### a. Anomalies des voies spermatiques, du pénis et du prépuce

Un défaut de drainage veineux au niveau du cordon spermatique provoque une dilatation locale des vaisseaux, appelée **varicocèle**. Sa fréquence est de 2% chez les béliers en Australie [Watt 1978]. On note tout d'abord, une tuméfaction de la partie dorsale du plexus pampiniforme, qui augmente progressivement de volume jusqu'à atteindre 15 à 18 cm et s'étend le long du cordon spermatique. Une thrombose des veines intratesticulaires est fréquente. L'origine est mal connue : on suspecte une augmentation de la pression sanguine associée à une fragilité de la paroi des vaisseaux du plexus pampiniforme. A un stade avancé, cette pathologie est extrêmement douloureuse du fait de la compression des nerfs. Elle handicape énormément l'animal qui refuse de se déplacer et encore plus de saillir. La qualité spermatique est très affectée : diminution du nombre de spermatozoïdes mobiles et de leur motilité individuelle, augmentation du pourcentage de spermatozoïdes anormaux. Aucun traitement n'est efficace, la réforme est à préconiser [Memon 1983].

L'**urolithiase** est une pathologie plus fréquente chez les mâles castrés mais qui est observée également chez des animaux reproducteurs. Les facteurs favorisants sont la privation d'eau et/ou la consommation excessive d'éléments minéraux (en particulier les phosphates). Des calculs urinaires se forment dans l'urine et, chez le mâle, peuvent se loger au niveau de l'inflexion sigmoïde ou du processus urétral. L'inflammation et l'irritation causée par les calculs entraînent l'obstruction de l'urètre. Les symptômes sont spécifiques : dos arqué, difficulté à uriner, anorexie, prostration [Memon 1983]. Si le calcul se situe dans le processus urétral, une urérostomie est envisageable avec un pronostic favorable pour la carrière reproductrice de l'animal [Smith 1986, Mickelsen et Memon 1997].

La **posthite** est une inflammation du pénis et la **balanite** est une inflammation de la muqueuse préputiale. La **balanoposthite** atteint à la fois le pénis et le prépuce. Elles peuvent être provoquées par une association entre un régime alimentaire trop riche en azote (18% ou plus de la ration) et une bactérie *Corynebacterium renale*. L'urée, contenue alors en grande quantité dans l'urine (>4%), est hydrolysée en ammoniac par la bactérie et irrite la muqueuse préputiale. Les symptômes sont des croûtes et des ulcères de la peau et de la muqueuse.

L'inflammation provoque, à moyen terme, le rétrécissement ou la sténose de l'orifice du prépuce [Memon 1983].

L'herpes virose peut être également responsable de balanoposthite, associée à une vulvovaginite chez la chèvre. Les symptômes sont plus ou moins importants selon le degré de surinfection bactérienne. Certains boucs sont contagieux (transmission du mâle à la femelle au moment du coït) mais la maladie est asymptomatique chez eux et donc difficile à diagnostiquer [Mickelsen et Memon 1997].

Le **phimosi**s est une incapacité du pénis à « sortir » du fourreau en raison d'un rétrécissement de l'orifice préputial ou consécutivement à la présence d'adhérences dans la région de l'inflexion sigmoïde. Un traumatisme ou une infection sont souvent à l'origine de cette pathologie. Chez les jeunes animaux pubères, une origine congénitale peut être envisagée [Mickelsen et Memon 1997, Memon 1983].

Le **paraphimosi**s est l'incapacité du pénis à réintégrer le fourreau du fait d'un œdème, d'une tuméfaction et/ou d'une balanoposthite. La striction, si elle n'est pas traitée rapidement, entraîne une nécrose du gland par ischémie [Mickelsen et Memon 1997, Memon 1983].

### **b. Anomalies des testicules et de l'épididyme**

L'infection du testicule, appelée **orchite** peut être chronique ou aiguë, uni ou bilatérale. Le testicule concerné est augmenté de volume, souvent chaud et douloureux. Des signes généraux comme de la fièvre, anorexie, perte de libido, et réduction des déplacements, sont généralement associés aux signes locaux. Les causes sont nombreuses : traumatisme, plaie avec corps étrangers, morsures de chien, infection systémique... Des germes comme *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* sont spécifiques du testicule et provoquent des épидидymo-orchites purulentes. Lors d'une infection aiguë, les symptômes apparaissent en 24 heures. Lors de maladie chronique, il y a une perte de la mobilité du testicule à l'intérieur du scrotum du fait de la présence de nombreuses adhérences fibreuses. L'atrophie du testicule est alors marquée : diminution de taille, induration et fibrose sont mises en évidence fréquemment [Memon 1983]. Les animaux atteints doivent le plus souvent être réformés.

L'**épididymite** est la plus fréquente cause de réforme chez le bélier. Sa fréquence est moins élevée chez le bouc. Les germes les plus souvent impliqués sont : *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* et *Chlamydia psittaci*. Les symptômes locaux sont une augmentation de volume de l'épididyme associée ensuite à une augmentation de la consistance de la queue et du corps de l'épididyme. Le testicule devient mou et s'atrophie progressivement. Dans la semence, une réduction du nombre de spermatozoïdes et une augmentation du nombre de leucocytes (signe d'alerte car d'apparition précoce au cours de l'infection) sont observées et, quelquefois, des *Brucella ovis* sont retrouvées dans le sperme. Il n'existe aucun traitement de cette pathologie donc les animaux malades doivent être diagnostiqués le plus tôt possible et abattus pour limiter la contagion. Dans le cas d'une infection par *Actinobacillus seminis*, des symptômes généraux tels que hyperthermie, anorexie, leucocytose sont également présents. Il est fréquent qu'un abcès se forme et s'ouvre sur l'extérieur. Cette pathologie est également incurable. D'autres germes ont pu être mis en évidence comme *Arcanobacterium pyogenes*, *Histophilus ovis*, *Pasteurella pseudotuberculosis*, et *Escherichia coli* [Memon 1983].

La fréquence des épididymites/abcès testiculaires est de 2% chez le bélier et de 0.1% chez le bouc en Australie [Watt 1978, Tarigan et al. 1990].

Les tumeurs de l'appareil génital sont rares chez les petits ruminants (moins de 1% chez le bélier et 0.2% chez le bouc en Australie [Watt 1978, Tarigan et al. 1990]). Il existe deux types principaux de tumeurs.

Le **séminome** est une tumeur des spermatogonies, qui peut être bénigne ou maligne, uni ou bilatérale. A la palpation, le testicule est plus petit et plus ferme. A la coupe, on note une grande quantité de tissus fibreux et un parenchyme marron foncé. A l'histologie, dans les premiers stades, seuls les tubes séminifères sont concernés par l'infiltration tumorale, puis les cellules tumorales envahissent le tissu interstitiel et finissent par gagner la vascularisation veineuse et lymphatique dans les stades les plus avancés [Memon 1983].

Le **sertolinome** est une tumeur des cellules de Sertoli. Elle se manifeste sous la forme d'un nodule de consistance ferme et de couleur crème dans le parenchyme du testicule. Histologiquement, une importante nécrose de coagulation est observée au niveau de la tumeur [Memon 1983].

Le **granulome spermatique** est une des causes les plus fréquentes de stérilité chez le bouc. Sa fréquence est de 0.3% chez le bouc en Australie [Tarigan et al. 1990]. Son origine n'est pas encore connue : elle pourrait être liée à une transmission héréditaire d'un gène récessif et à pénétrance incomplète ou du gène motte. Elle pourrait être associée également à un déficit en hormone thyroïdienne [Smith et Sherman 1994]. Au niveau de la tête de l'épididyme, quelques tubules efférents se terminent par des segments aveugles et ne permettent pas le transit des spermatozoïdes qui s'accumulent et entraînent éventuellement la rupture des canaux avec libération de spermatozoïdes dans le stroma et apparition d'une réaction inflammatoire importante et d'anticorps anti-spermatozoïdes. La stase spermatique entraîne la formation d'un spermatocoele. Lorsque les lésions sont plus avancées, on observe une accumulation de spermatozoïdes dans le tissu interstitiel du testicule. L'œdème testiculaire est suivi par une dégénérescence et une calcification du parenchyme. C'est une pathologie qui apparaît subitement sur des animaux auparavant fertiles qui deviennent stériles : en effet, les éjaculats ne contiennent plus de spermatozoïdes quand la lésion est bilatérale [Smith 1986].

### c. Anomalies des glandes annexes

La prostate, sous forme disséminée chez le bouc, et les glandes bulbourétrales sont rarement affectées chez les ruminants.

La **vésiculite** est une inflammation des vésicules séminales, fréquente chez le taureau. Deux types prédominent : une forme chronique, caractérisée par une augmentation de la taille, une fibrose importante et une perte de lobulation de l'organe et une forme dégénérative avec une diminution possible de taille et une perte de consistance de la vésicule. Chez les petits ruminants, cette pathologie est moins fréquente. Son origine est infectieuse. Les agents pathogènes les plus fréquemment isolés sont *Brucella melitensis*, *Actinobacillus seminis* et des bacilles gram négatifs [Ladds 1985].

### **3- Dégénérescence et calcification testiculaire**

#### **a. Définition**

La dégénérescence testiculaire est une atrophie du testicule associée à une diminution de la fertilité. Les manifestations cliniques sont une diminution de taille du testicule et une modification de sa consistance. A la coupe, on note une fibrose et des calcifications au sein du parenchyme. C'est la cause la plus fréquente de diminution de la fertilité chez le mâle.

Chez les taureaux et les boucs adultes, l'incidence des calcifications testiculaires varie de 10 à 30% selon les études [Ladds 1985, Barker 1956]. Fraser et Wilson [1966] ont observé une fréquence de 40% chez le bouc et de 3% chez le bélier. En Australie, l'incidence de cette pathologie est de 13% chez le bélier et 12% chez le bouc [Watt 1978, Tarigan et al. 1990]. Une étude réalisée en Inde, sur 3200 boucs, a mis en évidence 7 animaux (0.22%) présentant des lésions de calcification testiculaire [Desarkar et al. 1990]. En médecine humaine, la prévalence des microlithiases testiculaires varie de 0.05 à 0.6% : elle atteint des hommes jeunes (moyenne d'âge 29 ans) et peut même se rencontrer chez l'enfant. L'association de microlithiases avec une néoplasie testiculaire est observée dans 40% des cas [Oddo et al. 1998, Fernandez et al. 2001].

A la palpation, la consistance du testicule atteint de dégénérescence est modifiée : le testicule est plus ferme, ou quelquefois plus mou. Deux modifications de forme existent principalement : une diminution du diamètre horizontal qui donne l'impression d'un testicule plus allongé et une diminution générale de la taille, le testicule est alors plus petit et rond. Dans les deux cas, on observe une perte de la convexité à la base du testicule par rapport à un organe sain [Fraser 1971]. Une diminution de taille n'est observée que dans le cas d'une atteinte sévère [Blanchard et al. 1991b].

L'épididyme est rarement affectée et semble donc augmentée de taille, proportionnellement à la taille réduite du testicule : le rapport des deux peut être un bon moyen d'estimer l'importance de l'atrophie testiculaire [Blanchard et al. 1991b]. Lorsque le testicule est entièrement atteint, il devient très dur et des minéralisations apparaissent. La surface présente alors un aspect granuleux à la palpation [Ladds 1985].

A l'échographie, les zones de calcifications sont mises en évidence sous la forme de foyers hyperéchogènes dans le parenchyme testiculaire, le plus souvent à proximité du rete-testis.

Histologiquement, on observe une faible proportion de tubes séminifères avec des calcifications. Les lésions sont le plus souvent bilatérales et intratubulaires, localisées majoritairement à proximité du rete-testis. Dans les cas d'atteintes sévères, le stroma est également atteint et quelquefois, on observe une minéralisation de la membrane basale qui est épaissie. A l'intérieur des tubes séminifères, on observe des vacuoles cytoplasmiques, une desquamation des cellules germinales, une pycnose des noyaux des spermatocytes, la formation de cellules géantes (pouvant se retrouver dans la semence), une stase spermatique, une diminution de la taille des tubules avec un épaississement hyalin de la membrane basale, une fibrose et une hyperplasie des cellules interstitielles [Ladds 1985].

## **b. Etiologie**

Les facteurs à l'origine d'une dégénérescence testiculaire sont nombreux. Leurs répercussions sur l'aptitude du bouc à poursuivre sa carrière de reproducteur sont variables.

La spermatogenèse nécessite une température inférieure de quelques degrés à la température corporelle. Une température trop élevée du testicule entraîne l'apparition d'une dégénérescence testiculaire. C'est le cas d'un testicule ectopique intra-abdominal, d'un scrotum épaissi ou sous l'influence de pathologies locales comme des dermatites, de l'œdème, un hydrocèle (accumulation de liquide dans les enveloppes du testicule) ou une periorchite qui entraîne une augmentation locale de la température.

Une température ambiante trop élevée peut également avoir un effet néfaste sur le testicule chez le bélier et le taureau.

Des infections locales ou systémiques ont également un effet par l'intermédiaire de l'augmentation de la température du corps liée à la réaction fébrile et par la libération de toxines. Ce phénomène est retrouvé dans les cas d'épididymites ou d'orchites provoquées par *Brucella ovis*, de maladies parasitaires dues à des babesia, des anaplasmes ou des trypanosomes [Ladds 1985].

Le froid peut être également à l'origine d'une dégénérescence testiculaire en induisant des lésions vasculaires au niveau du scrotum et du plexus pampiniforme (nécrose): dans une

étude de Blanchard et al. [1991a] seulement 20% des 64 taureaux étudiés ont présenté une production spermatique normale 1 à 7 mois après la formation d'engelures au niveau du scrotum.

Les infections et les traumatismes provoquent une réaction inflammatoire, un œdème, une congestion, des modifications de la circulation sanguine qui ont pour conséquence une ischémie ou un infarctus des tissus concernés. Lors de passage à la chronicité, la dégénérescence testiculaire est associée à une atrophie et à une fibrose [Blanchard et al. 1991a].

Des carences ou des excès alimentaires peuvent provoquer des atteintes testiculaires. Par exemple, chez le bélier, une carence en vitamine A a une action indirecte sur le testicule en diminuant la production d'hormones gonadotropes par l'hypophyse, provoquant ainsi une dégénérescence testiculaire [Ladds 1985].

Un des minéraux qui a une action majeure sur le testicule est le zinc. Il fait partie des 9 oligo-éléments (Co, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Se, Zn et Cr) essentiels. Il est absorbé majoritairement au niveau de l'intestin grêle, stocké dans le foie, le pancréas, les os, la peau et les phanères. Son excrétion est fécale ou dans le lait pour les femelles en lactation [Paragon 1995].

Le zinc participe en tant que cofacteur au fonctionnement de nombreuses métalloenzymes comme l'ADN polymérase, l'ARN polymérase, l'ARNase qui interviennent dans la réplication de l'ADN et les synthèses protéiques. C'est un cofacteur de certaines enzymes du métabolisme des androgènes (la 5 $\alpha$  réductase qui transforme la testostérone en un métabolite actif (la dihydrotestostérone) d'où une diminution des teneurs en hormones stéroïdes circulantes [Paragon 1995, Nève 1995, Arnaud et Favier 1991]. C'est pourquoi, une carence en zinc a des répercussions majeures sur le fonctionnement testiculaire et peut être à l'origine d'une dégénérescence testiculaire.

Lors de carence prononcée en zinc, les symptômes principaux sont:

- une atteinte de l'état général avec abattement, une perte de poids due à l'anorexie s'accompagnant ou non de consommation de laine chez les ovins [Nelson et al. 1984]
- un ptyalisme avec production d'une salive mousseuse

- une alopecie généralisée ou en plaque localisée principalement au niveau du dos et de la nuque. La peau présente une dermatite avec de nombreuses croûtes, des squames, une parakératose importante. Il n'y a jamais de prurit associé. [Nelson et al. 1984, McDowell et al. 1991, Mills et al. 1967]
- un arrêt de croissance est mis en évidence chez les jeunes, ainsi qu'une diminution de la production laitière et de moins bonnes performances de reproduction chez les femelles [Mills et al. 1967]
- chez le mâle, l'atteinte testiculaire est fréquente avec une diminution de la spermatogenèse et à long terme une hypoplasie testiculaire [Nelson et al. 1984, Neathery et al. 1973, Cigankova et al. 1994].

Dans le cas de carence subclinique, on n'observe pas de lésions macroscopiques mais à l'histologie, le testicule présente une dégénérescence des cellules germinales après la méiose. Elles sont moins nombreuses et les tubes séminifères sont atrophiés. Dans un premier temps, les spermatogonies et les cellules de Sertoli ne sont pas concernées par ce phénomène mais elles finissent par dégénérer également. La spermatogenèse est arrêtée au stade spermatide [Cigankova et al. 1994, Cigankova et al. 1998, Takkar et al. 1968].

Le plus souvent consécutive à une torsion du cordon spermatique, une occlusion partielle ou totale des vaisseaux est une cause fréquente de dégénérescence testiculaire en provoquant des lésions d'ischémie ou des infarctus hémorragiques. On le rencontre également suite à un varicocèle. Il y a alors une stase veineuse dans le testicule avec accumulation de catécholamines qui ont une action vasoconstrictrice sur les tissus ce qui entraîne des lésions irréversibles. Il peut y avoir mise en contact de spermatozoïdes avec la circulation sanguine si il y a des lésions au niveau des capillaires, avec formation d'anticorps anti-spermatozoïdes. Ils sont à l'origine de lésions sur l'autre testicule, via la circulation sanguine générale [Blanchard et al. 1991a, Blanchard et al. 1991b].

L'âge est un facteur essentiel; des dégénérescences testiculaires sont fréquemment rencontrées chez des animaux âgés en relation avec une fragilisation de la paroi des vaisseaux sanguins [Ladds 1985].

Des obstructions de la tête de l'épididyme ou des malformations des tubules efférents, en empêchant la sortie du sperme, provoquent une stase spermatique, une augmentation de la

pression intra testiculaire à l'origine de l'atteinte testiculaire (granulome spermatique) [Ladds 1985, Blanchard et al. 1991a]. Des lésions du corps ou de la queue de l'épididyme ont moins de conséquences car il y a une résorption des fluides et des spermatozoïdes au niveau de la tête de l'épididyme [Ladds 1985].

Des produits chimiques, des sels métalliques, des radiations ioniques peuvent provoquer des lésions testiculaires. Par exemple, des traitements à base d'agents alcalins (trétamine, busulfan), d'antibiotiques (amphotéricine B, gentamycine), d'anticancéreux (cyclophosphamide, chlorambucil) ont une action nocive sur le testicule mais réversible à l'arrêt du traitement. Des plantes toxiques (*Astragalus lentiginosus*), des mycotoxines diminuent le nombre de spermatozoïdes matures, et augmentent le pourcentage de cellules souches anormales (vacuolisation des spermatogonies, des spermatocytes I et des cellules de Sertoli) [Ladds 1985].

La spermatogenèse est contrôlée par de nombreux facteurs hormonaux (cf. paragraphe sur spermatogenèse). L'administration, le défaut ou l'excès de production de l'un d'entre eux en perturbant le fonctionnement normal peut provoquer une dégénérescence testiculaire. Le plus souvent, c'est la conséquence d'une tumeur de l'hypophyse, de l'hypothalamus ou des cellules de Sertoli ou de Leydig [Ladds 1985].

L'administration d'hormones stéroïdes anabolisantes est capable d'induire une dégénérescence testiculaire par inhibition de la production d'hormones gonadotropes [Blanchard et al. 1991a, Blanchard et al. 1991b].

### **c. Diagnostic, pronostic et traitement**

Le diagnostic est avant tout clinique : on recherche une diminution de taille et/ou une modification de la consistance du testicule. A l'échographie, les calcifications intratubulaires sont mises en évidence sous forme de foyers hyperéchogènes dans le parenchyme testiculaire. La baisse de qualité de l'éjaculat n'est souvent perceptible que lorsque la dégénérescence concerne un grand nombre de tubes séminifères.

Le pronostic est fonction de la précocité du diagnostic et de l'intensité de l'atteinte : en effet, les lésions de dégénérescence et de calcification sont irréversibles. Si peu de tubes séminifères ont été détruits, l'influence sur la production de semence sera faible.

Le traitement consiste à limiter l'extension des lésions en soustrayant l'animal à l'action du facteur favorisant. Du fait du grand nombre d'étiologies possibles, il n'est pas toujours évident de diagnostiquer la cause d'apparition des lésions. En effet, le testicule répond de la même manière (dégénérescence testiculaire) à toutes les agressions qu'il subit.



**La calcification testiculaire chez le bouc  
de centres d'insémination artificielle :**  
étude clinique et répercussion  
sur la production de semence.

## **MATERIELS ET METHODES**

# **A- LES ANIMAUX**

## **1. Présentation**

Les boucs inclus dans cette étude appartiennent à deux races laitières françaises : la race Saanen (115 animaux, 44.4%) et la race Alpine (144 animaux, 55.6%). Ils sont issus d'accouplements programmés entre les meilleurs individus de la population. Ils sont répartis entre les deux centres d'insémination artificielle caprine, Capri-IA et INRA-SEIA. La période d'étude correspond au prétestage, c'est-à-dire les trois premiers mois de la première saison sexuelle (soit septembre, octobre et novembre) pendant laquelle les animaux sont collectés une vingtaine de fois. Les caractéristiques des animaux sont homogènes: âge équivalent, début de saison sexuelle, période et fréquence des collectes. Trois cohortes successives d'animaux (1999→ série P : 106 mâles, 2000→ série R : 59 mâles et 2001 → série S : 94 mâles) ont été intégrées au protocole. Ils sont âgés en moyenne de  $293 \pm 41$  jours (moyenne  $\pm$  ET) (rang de 200 à 374 jours) à la mise à la reproduction (date de la première collecte).

## **2. Conduite des animaux**

Les boucs sont logés dans des boxes individuels de  $9\text{m}^2$  régulièrement paillés. La ration est distribuée une fois par jour. Les boucs de Capri-IA reçoivent 400g de granulés (Aliment composé complémentaire pour chèvre laitière, Alicoop, Pamproux) et environ 3kg de foin de prairie/jour/animal. Les boucs de l'INRA-SEIA reçoivent 500g de granulés (Aliment composé complémentaire pour bouc, Ceaux en Couhé) et environ 3kg de foin de luzerne/jour/animal. L'abreuvement est à volonté. Le concentré et le fourrage de Capri-IA ont été analysés au Laboratoire d'Analyse et de Sécurité Alimentaire (Champdeniers). Ceux de l'INRA-SEIA ont été analysés au Laboratoire d'Alimentation de l'ENV Toulouse (31, France). La ration est calculée à l'aide du logiciel Larelev (Enjalbert, ENVT, 1989).

### **3. Critères d'exclusion de l'étude**

Certains boucs ont été exclus de l'étude sur la production de semence :

- 12 boucs ayant moins de 11 collectes de sperme sur la durée de l'étude pour différents motifs : absence de libido, maladies intercurrentes, décès. Les boucs de la série S (9 animaux) ont été intégrés à l'étude sur les zincémies et sur les volumes testiculaires.
- 1 bouc présentant une pathologie testiculaire (abcès), décelée à l'examen échographique, a été exclu de la totalité de l'étude.

## **B. MESURES EFFECTUEES SUR LES BOUCS**

### **1. *in vivo***

#### **a. Volume testiculaire**

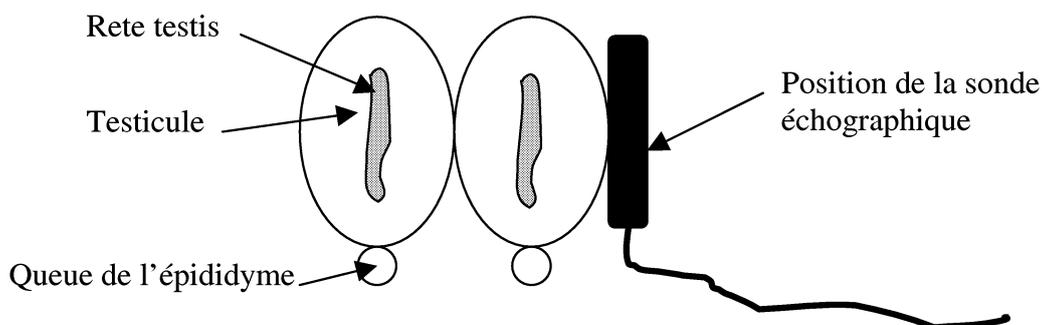
Le volume testiculaire a été estimé sur 103 boucs de la série S par palpation comparative à l'aide d'un orchidomètre. L'opérateur tient dans la main droite, le testicule droit de l'animal et dans l'autre main, le chapelet de boules de bois, étalonné de 40ml à 220ml avec un intervalle de 20ml entre chaque boule. La mesure est donnée par comparaison entre le volume du testicule et celui des boules de bois. Delgadillo Sanchez [1990] a montré qu'il existait une bonne corrélation entre le volume estimé par l'orchidomètre et le volume réel (mesuré après abattage des animaux) ( $r=0.86$ ) et une bonne répétabilité entre 2 opérateurs ( $r=0.96$ ). C'est donc une mesure fiable et répétable du volume testiculaire.

Deux mesures ont été effectuées sur tous les animaux de la série S, à un mois d'intervalle, soit en Octobre 2001 et Novembre 2001.

#### **b. Examen échographique**

Au cours de la période d'étude (1999-2001), une palpation suivie d'un examen échographique des testicules ont été réalisés chaque mois en septembre, octobre et novembre, soit 3 examens par animal.

L'appareil utilisé est un échographe 100LC Vet (Pie Medical Equipment BV, Maastricht, Pays- Bas) équipé d'une sonde linéaire à la fréquence de 8MHz. L'animal est maintenu en position debout par un aide, le manipulateur se plaçant derrière le bouc. Les testicules sont descendus au fond du scrotum d'une main et de l'autre, le manipulateur déplace la sonde sur le testicule. Des coupes longitudinales de chaque testicule ont été réalisées sur le bord latéral du testicule. La visualisation du rete testis permet de situer le plan médian du testicule (figure 10).



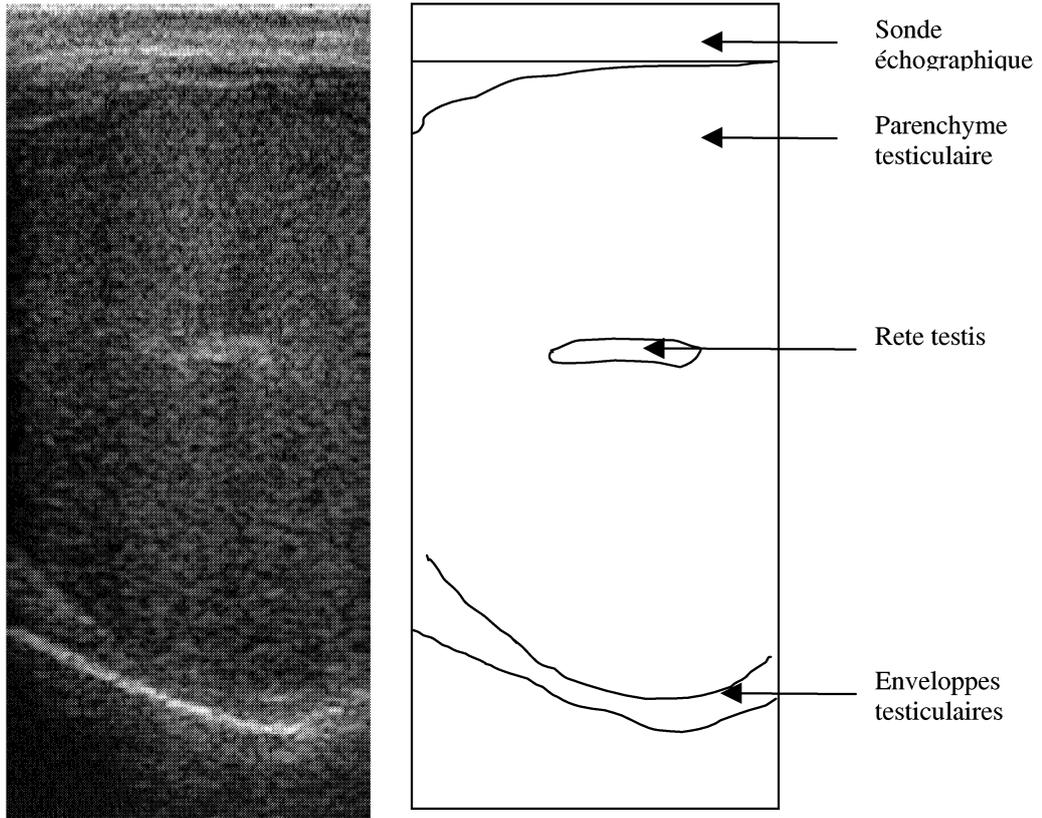
**Figure 10** : Représentation schématique de la réalisation d'une échographie testiculaire : réalisation d'une coupe longitudinale

Les images échographiques d'un testicule sain permettent de visualiser le parenchyme testiculaire, d'échogénicité moyenne et de structure homogène, le rete testis sous forme d'une zone centrale linéaire plus écho-gène. La visualisation du rete testis permet de situer la zone médiane du testicule. Les enveloppes testiculaires apparaissent comme des lignes hyperécho-gènes bordant le testicule. La queue de l'épididyme est plus difficilement explorable car de petite taille et le parenchyme est assez hétérogène et moins écho-gène que le testicule. Le plexus pampiniforme est aisément repérable dorsalement aux testicules sous la forme de nombreuses zones anécho-gènes circulaires qui correspondent à des coupes de vaisseaux sanguins [Ahmad et al. 1991].

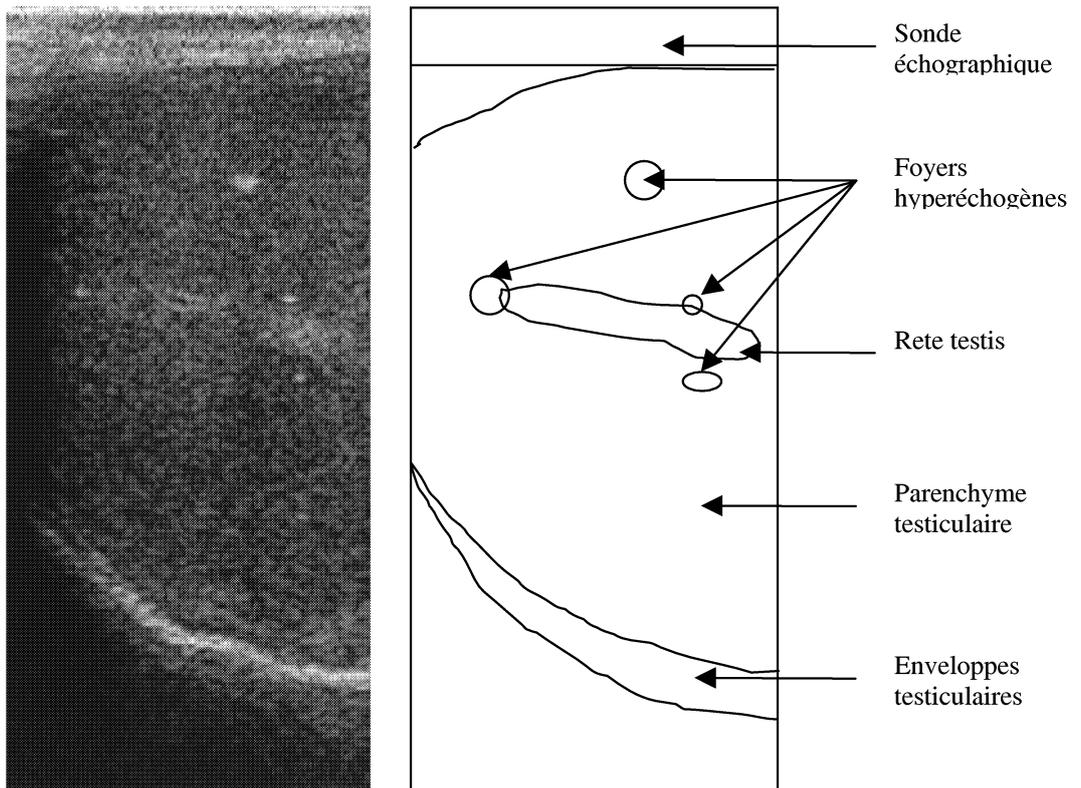
Afin de réaliser une évaluation semi-quantitative des lésions testiculaires, on utilise une échelle de référence allant de 0 (aucun foyer hyperécho-gène) à 4 (foyers hyperécho-gènes en grand nombre sur l'ensemble du testicule) (tableau 3). A chaque examen, une note est attribuée à chaque testicule par comparaison avec les images de référence (photographies 1 à 6).

<b>Note attribuée</b>	<b>Nombre de foyers hyperécho-gènes</b>
0	Aucun foyer hyperécho-gène
1	De 1 à 5 foyers hyperécho-gènes de petite taille
2	De 6 à 10 foyers hyperécho-gènes de petite ou grande taille localisés près du rete testis
3	Plus de 10 foyers hyperécho-gènes de petite et grande taille localisés près du rete testis
4	Plus de 20 foyers hyperécho-gènes disséminés dans tout le parenchyme testiculaire

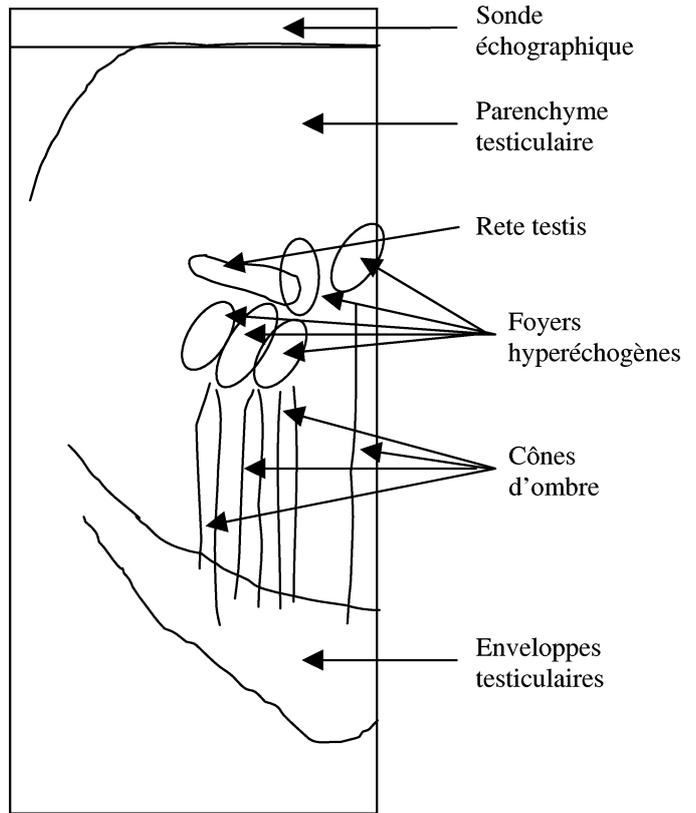
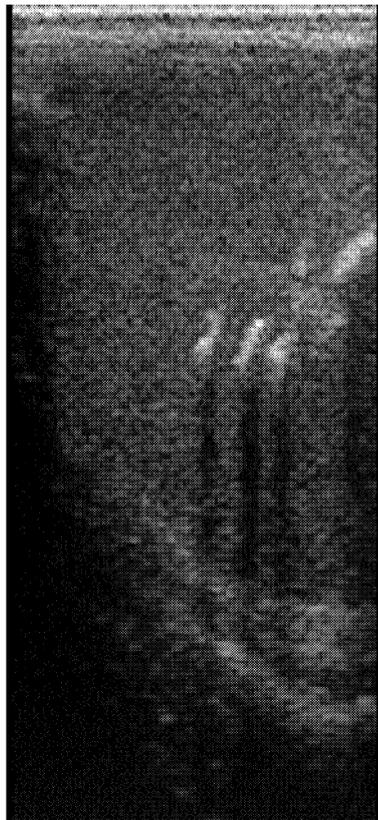
**Tableau 3** : Echelle semi-quantitative d'évaluation de la calcification testiculaire



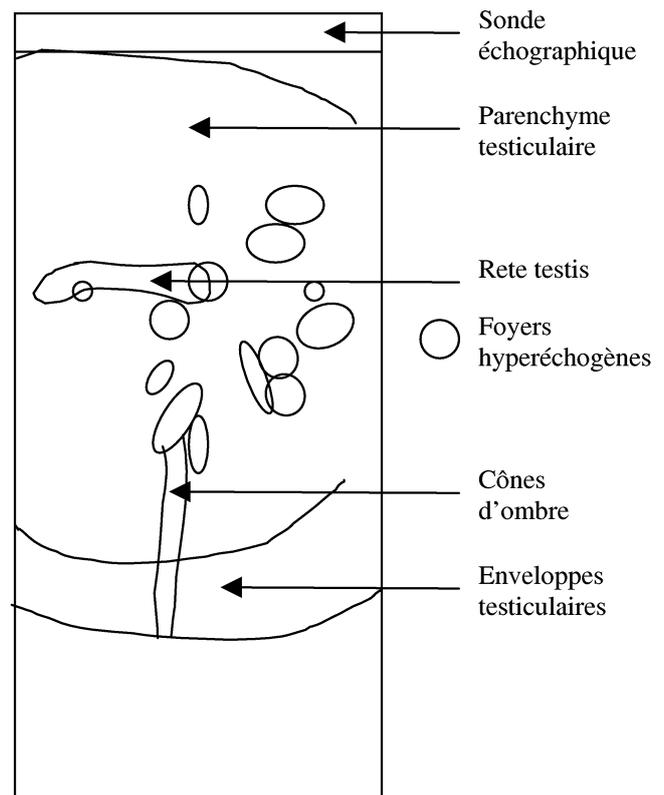
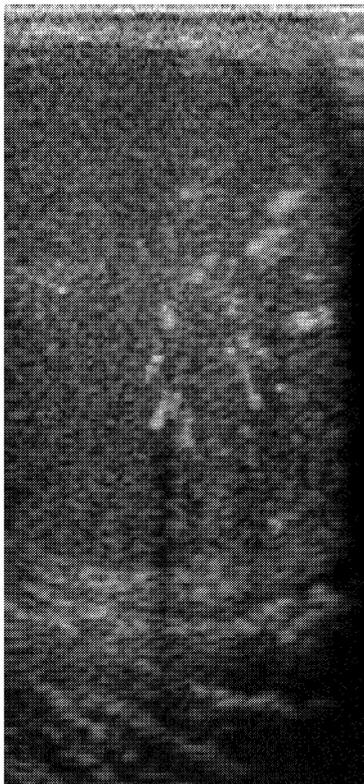
Photographie 1 : Image échographique d'un testicule sain de bouc (coupe longitudinale).



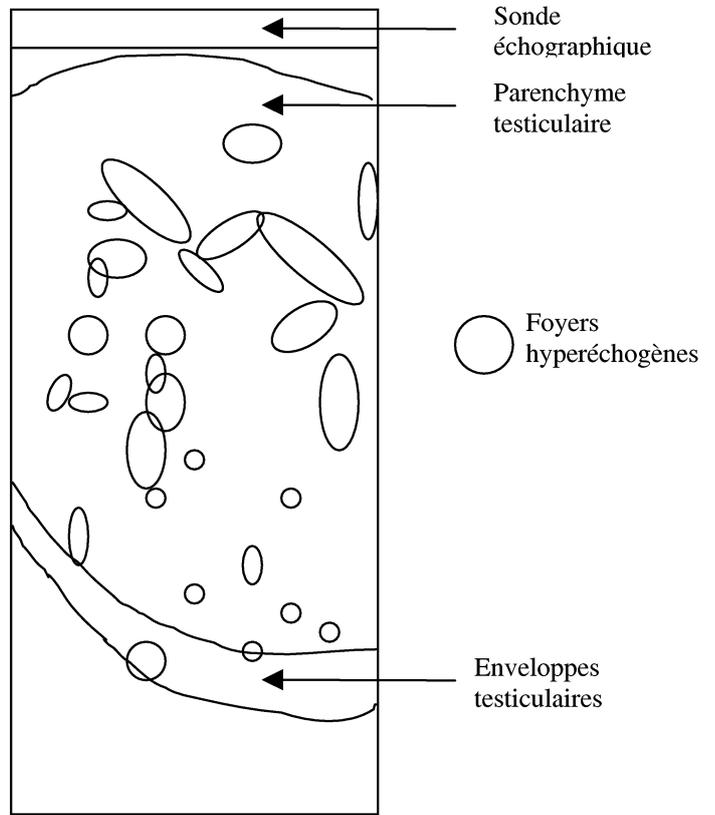
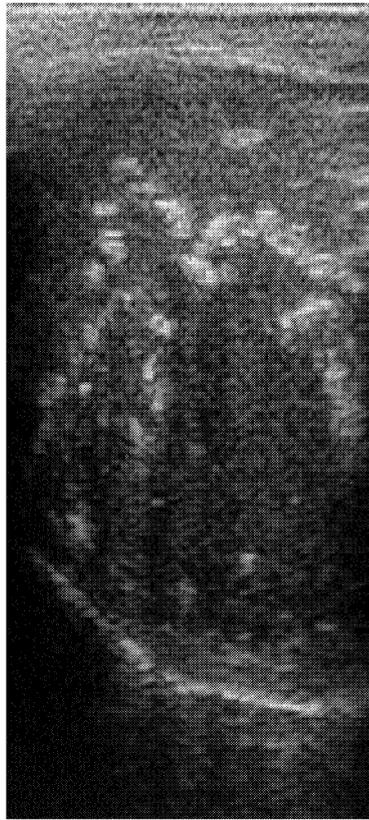
Photographie 2 : Image échographique d'un testicule de bouc : Note 1 = présence de quelques foyers hyperéchogènes de petite taille.



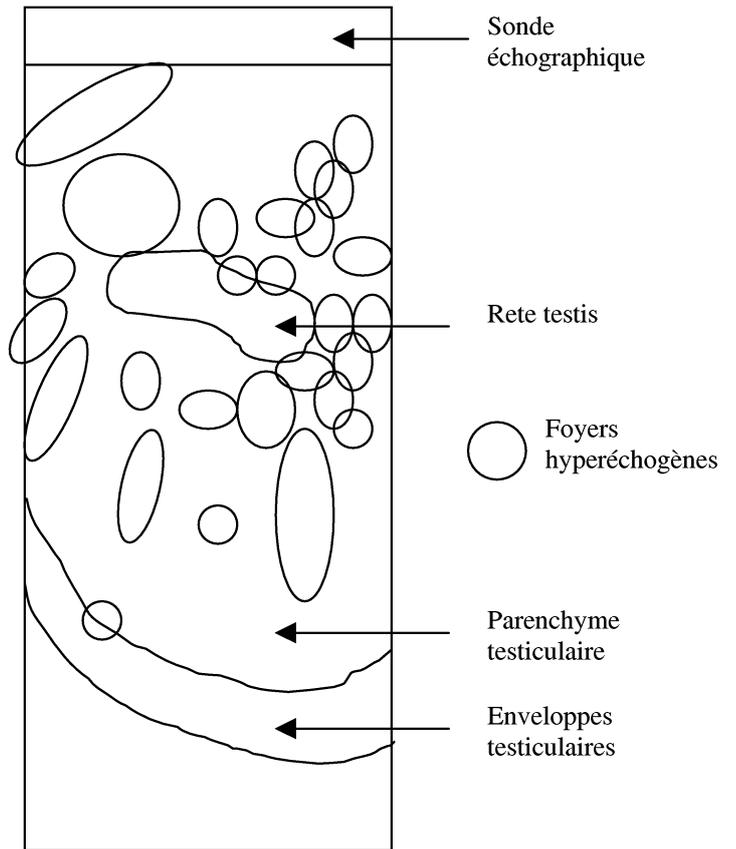
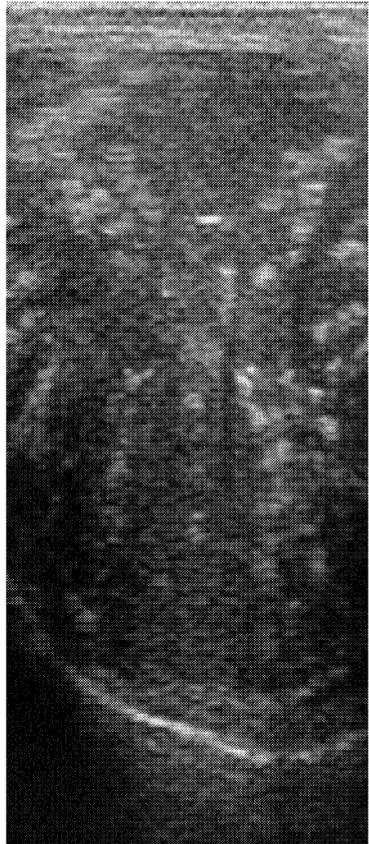
Photographie 3 : Image échographique d'un testicule de bouc : Note 2 = présence de quelques foyers hyperéchogènes de grande taille associés à des cônes d'ombre acoustique.



Photographie 4 : Image échographique d'un testicule de bouc : Note 2 = Présence de nombreux foyers hyperéchogènes



Photographie 5 : Image échographique d'un testicule de bouc :  
Note 3 = Présence de très nombreux foyers hyperéchogènes  
localisés près du rete testis de grande et petite taille.



Photographie 6 : Image échographique d'un testicule de  
bouc : Note 4 = présence de très nombreux foyers  
hyperéchogènes répartis sur l'ensemble du testicule.

### **c. Etude de la zincémie**

La zincémie a été dosée deux fois sur 102 boucs de la série S (Octobre et Novembre 2001) et sur 60 boucs de la même série avant (Avril 2002) et 45 jours après (Mai 2002) une administration de zinc.

Des prélèvements sanguins de 10ml sont réalisés par ponction de la veine jugulaire gauche. Le sang est transféré dans un tube héparinate à bille et mélangé par retournement. Dans les deux heures suivant le prélèvement, les tubes sont centrifugés (1200g pendant 10 min). Le plasma est récupéré et transféré dans des tubes de 5ml. La centrifugation et le stockage des tubes ont été réalisés se font à 4°C.

Afin de tester l'hypothèse d'une éventuelle carence en zinc, une administration de zinc (Prolontex Zinc®, Intervet, Angers, France) est réalisée par voie intramusculaire en deux points d'injection dans le tiers supérieur de l'encolure. La posologie est de 240mg de zinc, soit un volume de 4ml. A J0 (avant l'injection de zinc) et à J45, un prélèvement sanguin est réalisé afin de doser la zincémie.

Le zinc plasmatique a été dosé au laboratoire du service d'alimentation à l'école vétérinaire de Toulouse par spectrométrie d'absorption atomique après déprotéinisation par l'acide chlorhydrique à 10% selon la méthode de Lamand [1987].

## **2. Anatomopathologie du testicule**

### **a. Observation macroscopique**

Dix boucs ont été sacrifiés par saignée à la fin du prétestage (5 boucs sans atteinte testiculaire et 5 boucs présentant des zones hyperéchogènes à l'échographie). Ils sont âgés de  $370 \pm 28$  jours (moyenne  $\pm$  écart-type). Les testicules ont été récupérés dans un délai de 10 minutes après la mort de l'animal, la tunique vaginale a été excisée et le testicule décollé de l'albuginée. Les testicules ont été pesés (tableau 4) et incisés dans le plan sagittal pour observer les lésions macroscopiquement.

<b>Numéro bouc et statut pathologique</b>	<b>Testicule droit (g)</b>	<b>Testicule gauche (g)</b>	<b>Age (j)</b>
S118 (témoin)	102.3	100.3	391
S148 (témoin)	119.5	127.0	375
S149 (témoin)	76.9	83.3	318
S191 (témoin)	121.2	117.7	406
S193 (témoin)	97.5	91.7	400
S154 (atteint)	117.4	117.0	380
S309 (atteint)	108.3	107.4	331
S519 (atteint)	141.3	124.8	359
S161 (atteint)	145.0	144.2	361
S136 (atteint)	105.6	102.2	374

Tableau 4 : Poids (g) des testicules droit et gauche et âge (j) de 10 boucs après abattage, 5 animaux témoins et 5 animaux présentant des zones hyperéchogènes à l'examen échographique

## **b. Analyse histologique**

### Prélèvement et fixation tissulaire

Les testicules, coupés en deux dans le plan sagittal, puis en tranche de 1cm d'épaisseur, ont été fixés dans une grande quantité de formol à 10% tamponné à la neutralité (annexe 1) pendant 24 heures au moins.

Sur chaque testicule fixé, 3 cubes (ou 4 cubes pour deux testicules) d'environ 1 cm de côté ont été prélevés. Pour les animaux témoins, les prélèvements se situent à proximité du rete-testis (deux latéraux et un médial). Pour les animaux atteints, les prélèvements sont réalisés dans les zones lésionnelles, généralement à proximité du rete testis. Ces prélèvements ont ensuite été inclus en paraffine (soit 6 (ou 7) blocs par animal).

### Technique histologique

Des coupes sériées de 3-5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de chaque bloc ont été réalisées au microtome. Après récupération des coupes en milieu liquide (bain-marie à 40°C), elles sont étalées sur des lames de verre puis séchées à l'étuve à 56°C pendant 12 heures.

### Colorations histochimiques

Avant coloration, les lames subissent des étapes communes de déparaffinage et de réhydratation : les lames sont déparaffinées dans du toluène (1 bain de 5 minutes), puis réhydratées dans des bains successifs d'éthanol de concentration décroissante (1 bain de 5 minutes dans l'éthanol absolu puis 1 bain de 5 minutes dans l'éthanol à 95°), avant d'être lavées 5 minutes à l'eau courante.

Pour chaque prélèvement, une des coupes a été colorée à l'hémalum-éosine afin d'observer les lésions, leur nombre et leur répartition, sur des critères histologiques conventionnels. Une lame a été colorée par la coloration de Von Kossa qui permet de mettre en évidence de façon spécifique le calcium. Une troisième coupe a été colorée par le Trichrome de Masson afin de mieux visualiser la fibrose interstitielle qui accompagne les lésions tubulaires. Le tissu conjonctif collagénique est coloré en bleu.

#### 1/ Hémalum-éosine

Pour la coloration à l'hémalum-éosine (annexe 2), les lames déparaffinées et réhydratées sont plongées 20 secondes dans une solution d'Hémalum de Mayer (Merck, France), rincées et placées 12 secondes dans une solution d'Eosine-Erythrosine (Merck, France) aqueuse à 1%.

#### 2/ Trichrome de Masson

Le protocole de coloration au trichrome est présenté en annexe 3. Il consiste en une triple coloration : les noyaux sont colorés à l'hématoxyline (4 minutes), les cytoplasmes à la fushine Ponceau et le collagène par le bleu d'aniline (6 minutes).

#### 3/ Von Kossa

Le principe de la réaction de Von Kossa repose sur un traitement de la coupe au nitrate d'argent (annexe 4). L'argent se substitue au calcium au cours de la réaction (à l'obscurité, pendant 1 heure), et est ensuite révélé par réduction du sel d'argent à la lumière ultraviolette (3 heures). Les zones contenant initialement du calcium apparaissent ensuite sous la forme d'un précipité noir intense.

Après les différentes colorations, les lames sont déshydratées par des bains successifs d'éthanol de concentration croissante, puis placées dans du toluène. Des lamelles sont montées sur les lames à l'aide d'un baume synthétique (Micromount mounting medium, Labonord, France).

### Lecture

La lecture a été réalisée sur un microscope photonique Nikon Eclipse 400, à l'aide de différents objectifs (X4 à X40). La lecture a été réalisée en double, par moi-même et par I. Raymond, anatomo-pathologiste de l'ENVT. Les lésions observées ont été classées dans un tableau d'observations, en lésions principales et lésions associées :

<b>Lésions principales</b>	<b>Lésions associées</b>
Hypoplasie germinale	Dégénérescence périphérique
Spermiostase	Fibrose interstitielle
Calcification	

Afin de standardiser la lecture et de permettre une évaluation semi-quantitative des lésions, une zone de lecture a été tracée sur chaque lame. Cette zone représente un rectangle de 1 cm sur 0,7 cm sur laquelle il est possible d'observer en moyenne 1000 coupes de tubes séminifères (moyenne évaluée par comptage réel sur 6 lames).

Sur cette zone, différents paramètres ont été quantifiés :

- nombre de foyers avec calcification (sur lames au Von Kossa)
- nombre de coupes de tubes séminifères participant à la lésion
- nombre de tubes présentant une hypoplasie germinale
- nombre de tubes présentant une spermiostase
- nombre de tubes présentant des précipités de calcium
- absence ou présence de fibrose interstitielle en relation ou non avec les foyers de calcification (sur coupes au trichrome de Masson)
- absence ou présence de dégénérescence testiculaire en relation ou non avec les foyers de calcification.

## **C- EXAMEN SEMINOLOGIQUE**

Le sperme des boucs est collecté deux fois par semaine. Tous les éjaculats récoltés sont contrôlés puis congelés selon la technique utilisée en routine par les centres de production de semence caprins (cf paragraphe sur la production de semence dans la revue bibliographique). Seules les étapes concernant les paramètres étudiés sont décrites ici.

### **1. Evaluation quantitative des éjaculats frais**

Le volume de l'éjaculat (ml) est mesuré indirectement par pesée. La concentration est calculée par mesure de la densité optique par spectrophotométrie. L'appareil utilisé est un colorimètre 254 (Ciba-Corning GB distribué par Merck Eurolab), étalonné annuellement. Le protocole suivant est appliqué : 50µl de semence pure est diluée dans 10ml de solution de NaCl 9%, formolé à 0.1%. La densité optique mesurée est proportionnelle à la concentration en spermatozoïdes. Les valeurs sont données en milliard de spermatozoïdes par ml et permettent de calculer le nombre de spermatozoïdes totaux dans l'éjaculat.

### **2. Evaluation qualitative des éjaculats congelés**

Au minimum 24 heures après la congélation, la survie des spermatozoïdes *in vitro* est évaluée pour chaque éjaculat 5 minutes après décongélation. Une paillette contenant environ  $100 \times 10^6$  spermatozoïdes est décongelée dans un bain à 37°C pendant 20 secondes.

Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est évalué en microscopie optique à platine chauffante, entre lame et lamelle, sur une goutte de semence diluée (concentration entre 60 et  $80 \times 10^6$  spz/ml) à un grossissement X200. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et la motilité individuelle des spermatozoïdes, c'est à dire la qualité de leur déplacement sont estimés visuellement sur 5 champs d'observation. La motilité individuelle des spermatozoïdes est évaluée selon une échelle de référence de 0 (aucun mouvement) à 5 (spermatozoïdes « fléchants » avec une trajectoire rectiligne) (tableau 5) [Bishop et al. 1954]. Seuls sont

conservés pour être utilisés en insémination artificielle, les éjaculats dont le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est supérieur à 30% et dont la motilité est supérieure ou égale à 3.

Note attribuée	Aspect du mouvement
0	Pas de déplacement
1	Déplacements très lents ou absents, tremblements, oscillation de la queue
2	Déplacements lents, tremblements, mouvements inorganisés, quelques spermatozoïdes sont plus rapides
3	Déplacements curvilinéaires sans tremblements
4	Déplacements rapides, trajectoires rectilignes et courbes
5	Déplacements rapides et rectilignes : spermatozoïdes « fléchants »

Tableau 5 : Echelle de notation de la motilité individuelle des spermatozoïdes

### 3. Anomalies spermatiques

L'étude de la morphologie des spermatozoïdes a pour objectif de rechercher une éventuelle relation entre le pourcentage de spermatozoïdes anormaux, la nature des anomalies morphologiques et les lésions testiculaires observées à l'échographie ou à l'histologie. Elle est réalisée sur deux groupes de boucs participant à l'étude histologique : un lot témoin sans lésions testiculaires observées à l'échographie (5 animaux) et un lot avec des lésions mises en évidence à l'échographie (4 animaux).

Pour chaque animal, 4 paillettes de semence, correspondant à 2 éjaculats différents (2 paillettes par éjaculat) sont analysées après décongélation. Le colorant vital utilisé (éosine/nigrosine) marque spécifiquement les spermatozoïdes morts en pénétrant à travers les membranes plasmiques endommagées. Les paillettes sont décongelées à 37°C dans un bain-marie, puis la semence est centrifugée dans 1 ml de tampon Krebs-Ringer-Phosphate-Glucose (KRPG) (1000g pendant 10min) pour éliminer le glycérol. Le culot est resuspendu dans du KRPG (dilution finale, 200 millions de spermatozoïdes/ml). Le colorant et la semence sont maintenus à 37°C ainsi que tout le matériel (lame, platine chauffante du microscope). 40µl de semence et 20µl de colorant sont déposés sur une lame et mélangés doucement pendant 15 secondes. Un frottis est réalisé pour le comptage des spermatozoïdes sous microscope à immersion à huile, à un grossissement x1000. Pour chaque lame, 200 spermatozoïdes sont

comptés deux fois à deux endroits différents. Les différentes catégories prises en compte sont les spermatozoïdes vivants et morts normaux, les morts anormaux et les vivants anormaux en différenciant les anomalies de l'acrosome, de la tête, de la pièce intermédiaire, du flagelle et la présence de gouttelette cytoplasmique. Pour chaque animal et pour chaque éjaculat, la moyenne des 4 comptages (2 paillettes par éjaculat et 2 comptages par paillette) est calculée.

## **D- ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS**

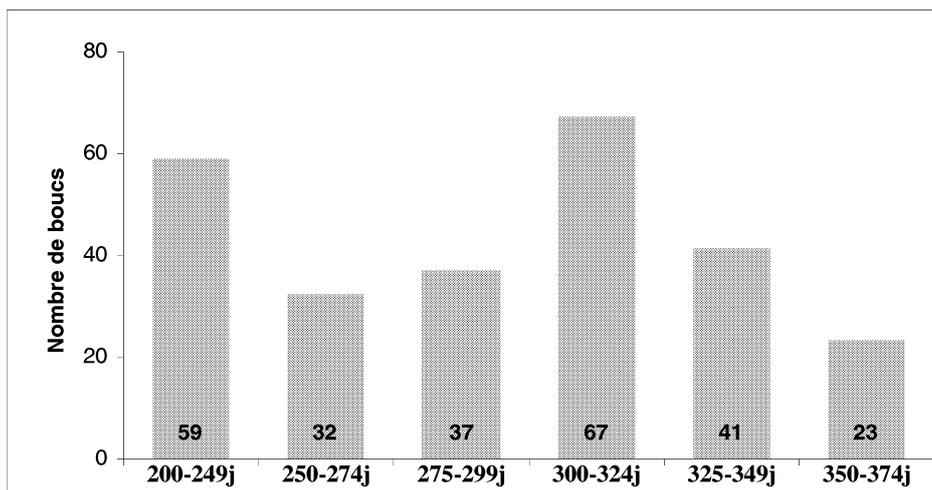
Pour mettre en relation l'atteinte testiculaire d'un animal et sa production de semence sur la période de l'étude, des variables synthétiques ont été calculées. Ainsi, pour chaque animal, une seule valeur permet d'apprécier le niveau de sa production spermatique pour chaque paramètre étudié, et une seule note permet d'estimer l'importance de l'atteinte testiculaire. Ces notes synthétiques servent à comparer les animaux entre eux.

### **1. Paramètres étudiés**

#### **a. Production de semence**

Pour tous les animaux, à partir du cahier de collecte, les données suivantes sur la production de semence ont été retenues pour l'étude :

- Identification du bouc : code centre d'insémination
- Race : Alpine ou Saanen
- Série de boucs, correspondant à l'année : P→ 1999, R→ 2000, S→ 2001.
- Paramètres quantitatifs : volume de l'éjaculat, nombre de spermatozoïdes totaux
- Paramètres qualitatifs : pourcentage de spermatozoïdes mobiles et motilité individuelle des spermatozoïdes après congélation/décongélation
- Pour les paramètres séminologiques étudiés, une valeur moyenne a été calculée pour l'ensemble des éjaculats de la période.
- Pour le volume et le nombre de spermatozoïdes totaux, la production totale au cours de la période d'étude a été calculée.
- Date de collecte : cette information a permis de calculer l'âge à la collecte. Seul l'âge à la première collecte ou âge à la mise à la reproduction a été retenu pour évaluer l'influence de l'âge. Les animaux ont été répartis en classe d'âge de 25 jours sauf les deux premières classes à faibles effectifs qui ont été fusionnées en une classe unique de 50 jours (figure 11). La répartition des boucs dans les classes d'âge est relativement homogène.



**Figure 11** : Répartition des 259 boucs dans chaque classe d'âge pour la période d'étude 1999-2001 (nombre).

### **b. Examen échographique**

Les paramètres étudiés sont les suivants :

- note échographique : 1 note par testicule et par examen échographique soit 6 notes par animal
- note synthétique échographique: les animaux ont été classés en trois catégories : A (toutes les notes échographiques = 0, n = 92), B (au moins une note échographique = 1 ou 2, pas de note 3 ou 4, n = 142), C (au moins une note échographique égale à 3 ou 4, n = 25). L'effectif des groupes étant déséquilibré, certaines études n'ont pris en considération que deux groupes : Témoin (aucune atteinte échographique = A) et Atteint (lésions testiculaires mises en évidence à l'échographie = B + C).

## **2. Analyses statistiques**

### **\* Effet de la période et de la série sur la note échographique**

L'influence de la période (examen échographique 1, 2 ou 3) et de la série (P, R ou S) sur la pathologie testiculaire a été testée par une analyse de variance à 2 facteurs (ANOVA, SYSTAT<sup>®</sup> version 6, Inc., Evanston, IL). Pour obtenir une variable continue à partir des notes

échographiques, la variable considérée est le logarithme de la moyenne des 2 notes des testicules droit et gauche +1. Le modèle est le suivant :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha*\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  représente le Ln[moyenne(note testicule droit + note testicule gauche)+1].  $\mu$  est la moyenne générale,  $\alpha_i$  l'effet période,  $\beta_j$  l'effet série,  $(\alpha*\beta)_{ij}$  l'effet de l'interaction entre l'effet série et celui de la période et  $\varepsilon_{ijk}$  la valeur résiduelle.

#### **\* Effet de la race ou de la série ou de l'âge sur la note échographique**

L'influence de ces trois facteurs a été testée par un test  $\chi^2$  (chisq, SAS<sup>®</sup>, version 6).

#### **\* Effet de l'âge sur le volume testiculaire**

L'influence de l'âge des animaux sur le volume testiculaire a été testée par un test de corrélation (corr, SAS<sup>®</sup>, version 6).

#### **\* Effet de la pathologie testiculaire sur le volume testiculaire**

L'influence de la pathologie testiculaire sur le volume testiculaire a été testée par une analyse de variance. Les variables analysées sont les volumes testiculaires mesurés à un mois d'intervalle. L'influence du facteur groupe : A (non atteint), B (atteinte testiculaire modérée) et C (atteinte testiculaire sévère) a été analysée par une analyse de variance à 2 facteurs (ANOVA, SYSTAT<sup>®</sup> version 6, Inc., Evanston, IL), selon le modèle suivant :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  représente le volume testiculaire mesuré deux fois à un mois d'intervalle.  $\mu$  est la moyenne générale,  $\alpha_i$  l'effet groupe,  $\beta_{ij}$  l'effet bouc j niché dans le groupe i et  $\varepsilon_{ij}$  la valeur résiduelle.

#### **\* Effet de la zincémie sur la note échographique**

Pour chaque groupe et chaque période de prélèvements sanguins, les moyennes et les écart-types des concentrations plasmatiques en zinc ont été calculés. Les variables analysées sont les concentrations plasmatiques de zinc. Dans la première expérience, l'influence du facteur groupe : A (non atteint), B (atteinte testiculaire modérée) et C (atteinte testiculaire sévère) et du facteur période (1, 2 et 3) a été analysée par une analyse de variance à 2 facteurs

(ANOVA, SYSTAT<sup>®</sup> version 6, Inc., Evanston, IL) selon le modèle suivant :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha \cdot \beta)_{ij} + \delta_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  représente la concentration plasmatique de zinc,  $\mu$  est la moyenne générale,  $\alpha_i$  l'effet groupe,  $\beta_j$  l'effet de la période,  $\alpha_i \cdot \beta_j$  l'interaction entre l'effet du groupe et celui de la période,  $\delta_{ik}$  l'effet bouc  $k$  niché dans le groupe  $i$  et " $\varepsilon_{ijk}$ " la valeur résiduelle. Les comparaisons multiples ont été effectuées après correction de Bonferroni.

Dans la seconde expérience, le même modèle a été utilisé, mais les 2 périodes étudiées sont : avant administration de zinc (période 3) et après administration de zinc (période 4). La relation entre l'amplitude de l'augmentation de la zincémie après administration de zinc (c'est à dire la différence entre les concentrations de zincémie 45 jours après administration et celles avant administration) et la concentration plasmatique de zinc avant administration a été testée par un test de corrélation de Pearson.

#### **\* Effet des pères et des grands-pères sur la note échographique de leur descendance**

L'influence des pères et des grands pères sur la pathologie testiculaire a été testée par une analyse de variance à 2 facteurs (ANOVA, SYSTAT<sup>®</sup> version 6, Inc., Evanston, IL). Pour obtenir une variable continue à partir des notes échographiques, la variable considérée est le logarithme de la moyenne des 6 notes échographiques (3 périodes, testicules droit et gauche) +1. Le modèle est le suivant :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  représente le Ln[moyenne(6 notes)+1].  $\mu$  est la moyenne générale,  $\alpha_i$  l'effet grand-père,  $\beta_j$  l'effet père  $j$  niché dans le groupe grand père  $\alpha_i$  et  $\varepsilon_{ij}$  la valeur résiduelle.

Les grand-pères qui n'ont eu qu'un seul fils donnant naissance à des boucs de la population ont été éliminés (A190; B310; C203; C206; D119; E106; E116; E155; E191; F134; F175; F178; F180; G311).

**\* Effet de l'atteinte testiculaire, de la race, de l'âge et de la série sur les paramètres séminologiques**

L'influence de la race, de la série, de l'âge et de la pathologie testiculaire a été testée par une analyse de covariance à 4 facteurs (ANCOVA, SYSTAT<sup>®</sup> version 6, Inc., Evanston, IL). Le modèle est le suivant :

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + D_l + (A*B)_{ij} + (A*C)_{ik} + (A*D)_{il} + (B*C)_{jk} + (B*D)_{jl} + (C*D)_{kl} + (A*B*C)_{ijk} + (A*C*D)_{ikl} + (B*C*D)_{jkl} + (A*B*C*D)_{ijkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

$Y_{ijkl}$  représente le paramètre séminologique considéré (volume moyen, volume total, nombre moyen de spermatozoïdes par éjaculat, nombre total de spermatozoïdes par éjaculat, note de motilité moyenne, note de mobilité moyenne).  $\mu$  est la moyenne générale,  $A_i$  l'effet période,  $B_j$  l'effet série,  $C_k$  l'effet groupe (sain *versus* atteint),  $D_l$  l'effet âge, comme covariable, puis l'effet des 6 interactions doubles, des 4 interactions triples et de l'interaction quadruple et  $\varepsilon_{ijkl}$ , la valeur résiduelle.

Pour les paramètres note de mobilité moyenne et note de motilité moyenne, la variable considérée est le logarithme népérien de la note moyenne pour satisfaire à la condition d'homogénéité des variances.

**\* Effet de l'atteinte testiculaire sur les anomalies spermatiques**

L'influence de la pathologie testiculaire sur les anomalies spermatiques a été testée par une analyse de variance à 2 facteurs (ANOVA, SYSTAT<sup>®</sup> version 6, Inc., Evanston, IL). Le modèle est le suivant :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  représente l'anomalie spermatique considérée,  $\mu$  est la moyenne générale,  $\alpha_i$  l'effet groupe (sain *versus* atteint),  $\beta_j$  l'effet bouc  $j$  niché dans le groupe pathologie et  $\varepsilon_{ij}$  la valeur résiduelle.

**\* Seuil de signification**

Pour l'ensemble des tests statistiques utilisés, le seuil de signification a été fixé à  $P=0.05$ .

**La calcification testiculaire chez le bouc  
de centres d'insémination artificielle :**  
étude clinique et répercussion  
sur la production de semence.

## **RESULTATS**

## A- ETUDE DES LESIONS TESTICULAIRES

### 1. Examen échographique

La figure 12 montre, pour les trois séries étudiées, la répartition des boucs sains et atteints de lésions testiculaires détectées par examen échographique. Sur les trois années concernées, 64% des boucs de centre d'insémination artificielle présentent des lésions testiculaires détectées à l'échographie, proportion en augmentation chaque année.

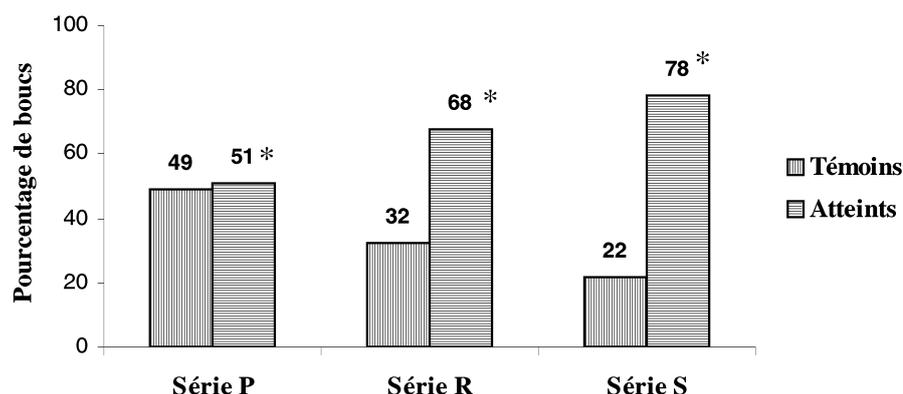


Figure 12 : Pourcentage de boucs en fonction de l'atteinte testiculaire détectée par examen échographique pour chaque série (P→1999, R→2000, S→2001). Le test Khi-2 met en évidence un effet significatif ( $P=0.001$ ) de la série sur l'atteinte testiculaire (\*).

La figure 13 montre l'évolution au cours du temps du nombre de notes (0 à 4) attribuées à l'examen échographique des animaux des trois séries (P, R et S). On observe une diminution au cours du temps du nombre d'animaux sains et une augmentation du nombre d'animaux atteints. L'analyse de variance met en évidence un effet de la période ( $P < 0.001$ ), de la série ( $P < 0.001$ ) et de l'interaction période\*série ( $P = 0.03$ ) sur la note échographique.

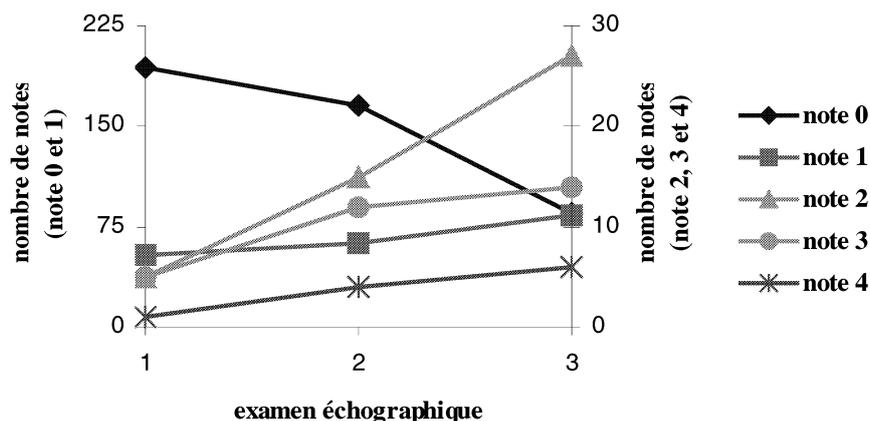


Figure 13 : Evolution du nombre de notes échographiques (0 à 4) en fonction de la période d'examen (1→septembre, 2→octobre, 3→novembre) pour l'ensemble des séries (P, R, S).

Les tableaux 6 et 7 présentent la répartition des boucs sains et atteints de dégénérescence testiculaire en fonction respectivement, de la race et de l'âge à la mise à la reproduction.

La proportion de boucs atteints de lésions testiculaires détectées par examen échographique est plus importante pour la race Alpine (71%) que pour la race Saanen (56%) ( $P=0.02$ , Khi-2) (tableau 6). Environ 2/3 des animaux sont atteints quelque soit la classe d'âge de mise à la reproduction. L'analyse statistique ne met pas en évidence de différence du pourcentage de boucs atteints entre les classes d'âge ( $P=0.19$ , Khi-2) (tableau 7).

Race	Atteinte testiculaire	
	Sains	Atteints
Saanen	50 (44 %)	65 (56 %)
Alpin	42 (29 %)	102 (71 %)

Tableau 6 : Répartition des animaux en fonction de l'atteinte testiculaire détectée par examen échographique et de la race (nombre, pourcentage). L'analyse de Khi-2 met en évidence un effet significatif ( $P=0.02$ ) de la race sur l'atteinte testiculaire.

Age (j)	Atteinte testiculaire	
	Sains	Atteints
200-249	29 (49 %)	30 (51 %)
250-274	11 (34 %)	21 (66 %)
275-299	11 (30 %)	26 (70%)
300-324	22 (33 %)	45 (67 %)
325-349	14 (34 %)	27 (66 %)
350-374	5 (22 %)	18 (78 %)

Tableau 7 : Répartition des animaux (nombre, pourcentage) en fonction de l'atteinte testiculaire détectée par examen échographique et des différentes classes d'âge de mise à la reproduction. L'analyse de Khi-2 ne met pas en évidence d'effet âge à la mise à la reproduction sur l'atteinte testiculaire observée à l'échographie.

## 2. Volume testiculaire

La figure 14 présente les valeurs individuelles des volumes des testicules droits de 103 boucs de la série S en fonction de l'âge des animaux. Les volumes ont été estimés par orchidométrie sur deux périodes, octobre et novembre 2001. L'analyse statistique ne montre pas de corrélation entre le volume testiculaire et l'âge des animaux (Octobre:  $r = 0.33$ , et Novembre:  $r = 0.28$ ).

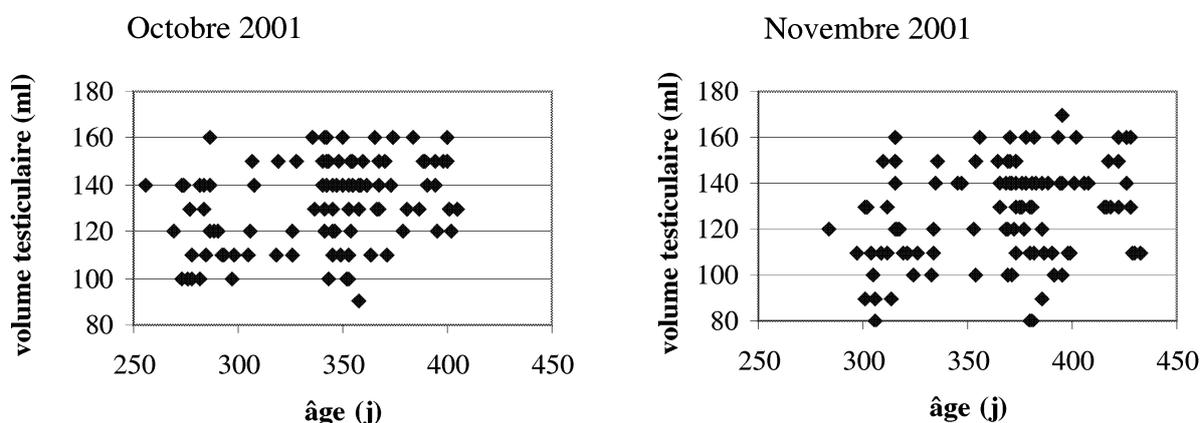


Figure 14 : Répartition des volumes du testicule droit estimé par orchidométrie (ml) en fonction de l'âge (j) des boucs, pour les animaux de la série S (n=103 en Octobre et n=102 en Novembre 2001).

Le tableau 8 présente les volumes testiculaires estimés par orchidométrie des animaux de la série S, en fonction de l'atteinte testiculaire détectée par examen échographique. L'analyse de variance ne montre pas d'effet significatif de l'atteinte testiculaire sur le volume testiculaire.

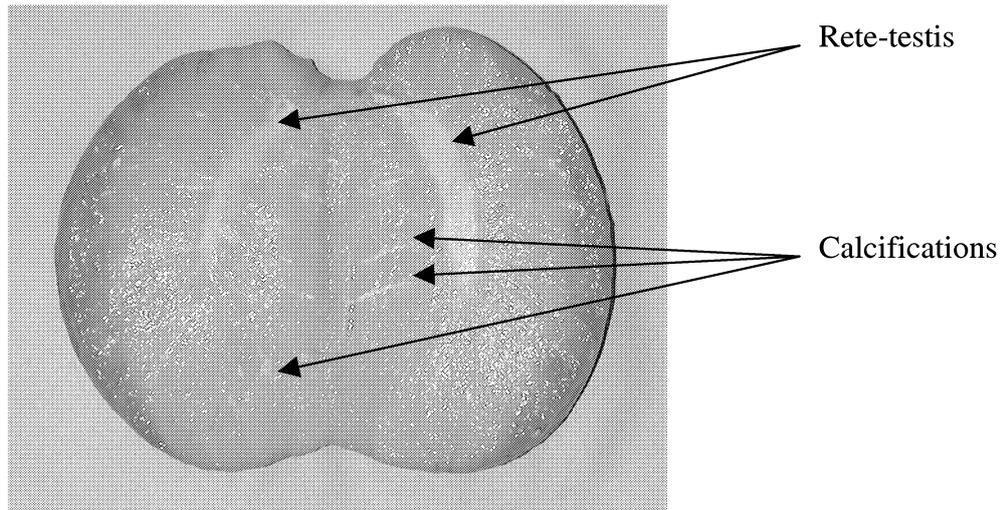
<b>Note synthétique échographique</b>	<b>Volume testiculaire (ml) (Octobre 2001)</b>	<b>Volume testiculaire (ml) (Novembre 2001)</b>	<b>Effectif</b>
<b>A</b>	133 ± 17	127 ± 22	26
<b>B</b>	130 ± 19	126 ± 22	65
<b>C</b>	139 ± 17	135 ± 17	12

Tableau 8 : Moyenne (± ET) des volumes des testicules droits estimés par orchidométrie des 103 animaux de la série S, en fonction de la note synthétique échographique (A : aucune atteinte testiculaire, B : atteinte modérée, C : atteinte sévère).

### **3. Etude histologique des testicules**

#### **a. Description des lésions macroscopiques**

L'observation macroscopique des testicules a permis de confirmer l'absence de lésions chez les animaux témoins. Les testicules des animaux atteints de lésions modérées à l'échographie, présentent des zones punctiformes de couleur jaunâtre à proximité du rete testis. Les animaux les plus atteints présentent ces mêmes lésions en plus grand nombre et sur l'ensemble du testicule jusqu'à sa périphérie. Des lésions de plus grande taille, linéaires, sont également visibles, en étoile autour du rete testis (photographie 7). L'hyperhémie périphérique est un artéfact post-mortem.

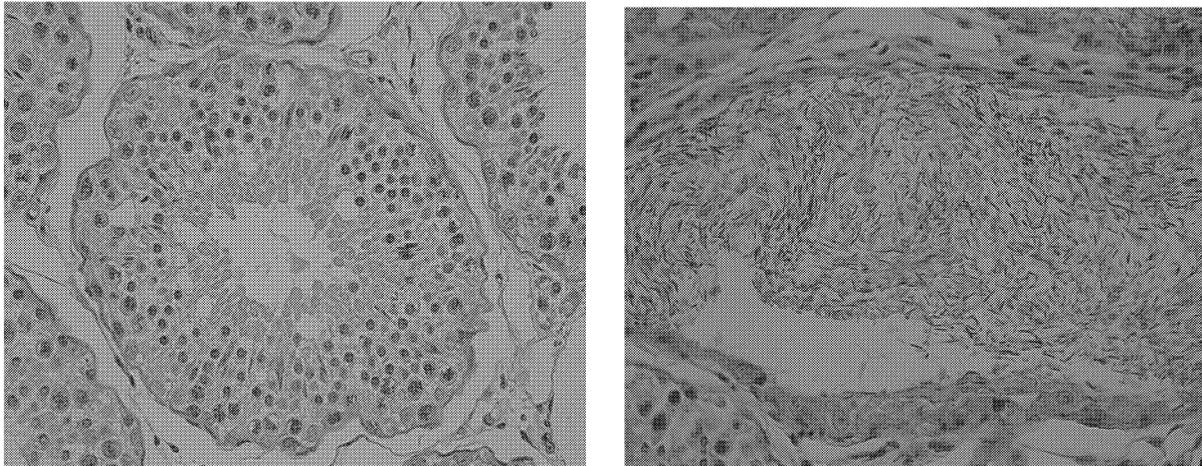


Photographie 7 : Coupe longitudinale de testicule de bouc présentant de nombreuses calcifications dans le parenchyme testiculaire.

### **b. Description des lésions histologiques**

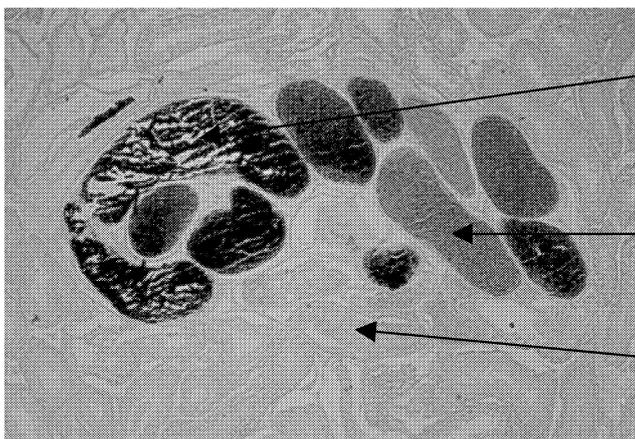
Les lésions observées à l'histologie ont été regroupées en deux groupes : les lésions principales comprenant l'hypoplasie, la spermiostase, les calcifications et les lésions secondaires associées ou non aux lésions principales, la fibrose et la dégénérescence testiculaire. Chaque lésion est définie comme suit :

- **Hypoplasie** : tubes séminifères avec disparition partielle ou totale de la lignée germinale, puis des cellules de Sertoli pour aboutir, dans les stades les plus sévères à un tube nu, limité à la membrane basale (photographie 10).
- **Spermiostase** : accumulation de spermatozoïdes en quantité plus ou moins importante, dans la lumière de tubes séminifères souvent hypoplasiques. On aboutit dans les stades les plus sévères à un tube nu dont la lumière, souvent dilatée, ne contient que des spermatozoïdes tassés en très grand nombre (photographies 8, 9).



**Photographie 8 :** Coupes de tubes séminifères sains (figure gauche) et présentant une stase spermatique débutante (figure droite). La lumière du tube séminifère est remplie de spermatozoïdes et l'épithélium germinale a disparu (coloration Hémalum-éosine, X400).

- **Calcification :** les stades les plus sévères de spermiostase s'accompagnent d'une dégénérescence et d'une nécrose des spermatozoïdes accumulés avec une calcification progressive du matériel de nécrose. Ce matériel présente de moins en moins de "silhouettes" de spermatozoïdes et prend un aspect plus cristallin, granuleux, basophile à l'hémalum-éosine et noir intense à la coloration de Von Kossa. Les stades ultimes présentent un matériel amorphe, cristallin, fragile (souvent abîmé lors des coupes histologiques) constituant le contenu exclusif de la silhouette tubulaire (photographies 9, 10).



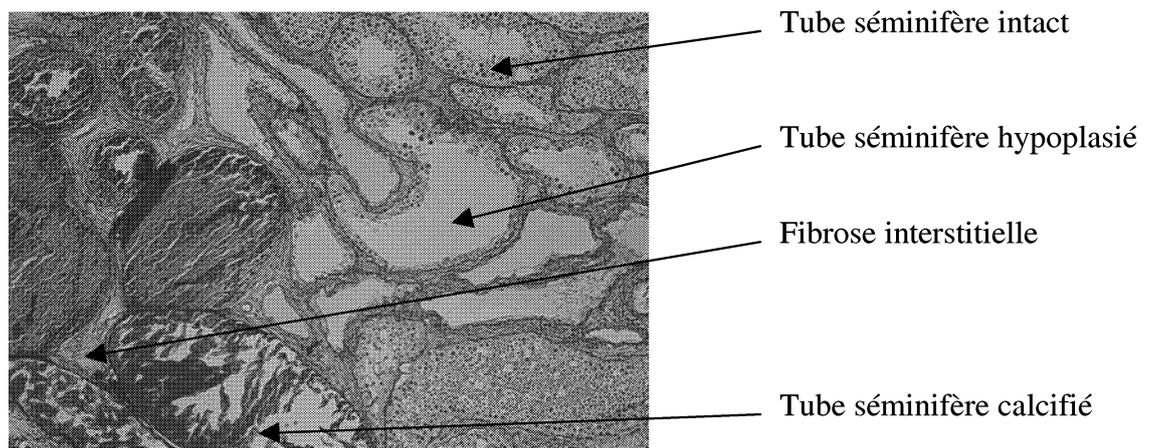
**Stade final :**  
Structure amorphe  
et cristalline

**Stade intermédiaire :**  
les spermatozoïdes  
ne sont plus identifiables

**Stade débutant :**  
présence de "fantômes"  
de spermatozoïdes

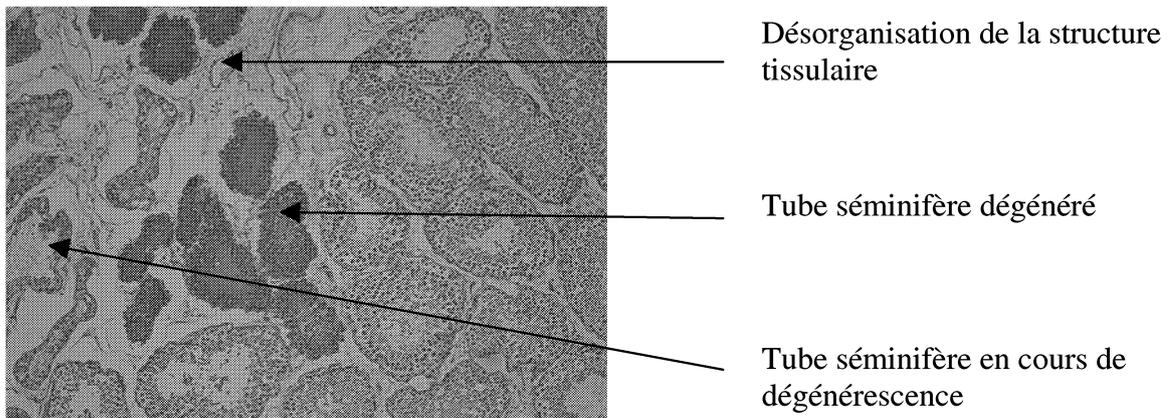
**Photographie 9 :** Coupes de tubes séminifères présentant différents degrés de stase spermatique et de calcification (Coloration de Von Kossa, X40).

- **Fibrose** : les foyers de lésions des tubes séminifères observées à la coloration hémalum-éosine présentent souvent une augmentation de l'interstitium du fait de l'accumulation d'un tissu collagénique plus abondant, non inflammatoire, qui sépare les silhouettes tubulaires. Cet aspect de fibrose interstitielle plus marquée dans les zones lésionnelles est facilement mis en évidence grâce à la coloration au trichrome de Masson (photographie 10). Cette fibrose se retrouve également autour de tubes séminifères non lésés.



Photographie 10 : Coupes de tubes séminifères présentant une association de lésions principales (hypoplasie et calcification) et de lésions secondaires (fibrose) (Coloration au trichrome de Masson, X100).

- **Dégénérescence** : Sur quelques prélèvements, l'examen microscopique a permis de mettre en évidence des plages plus ou moins étendues de dégénérescence tubulaire précoce. Les tubes présentent une coloration beaucoup plus intense, rose, légèrement laquée avec des images de dégénérescence nucléaire, associées à une desquamation des cellules dans la lumière tubulaire et à la formation d'un amas protéique nuageux et globulaire (photographie 11).



Photographie 11 : Coupes de tubes séminifères présentant une dégénérescence testiculaire avec désorganisation de la structure du tissu (Coloration à l'hémalum-éosine, X100).

### c. Résultats semi-quantitatifs

Le tableau 9 présente le nombre moyen (sur 6 ou 7 prélèvements par animal) de coupes de tubes séminifères présentant des lésions principales et le nombre de prélèvement présentant des lésions secondaires pour chaque animal (5 boucs sains et 5 boucs présentant des lésions testiculaires à l'examen échographique).

Pour les animaux témoins, aucune lésion principale n'a été observée. Des lésions de fibrose ont été mises en évidence sur 4 animaux, soit 10 prélèvements sur 30. La dégénérescence testiculaire a été observée sur 2 animaux, soit 2 prélèvements sur 30.

Pour les animaux atteints, les différentes lésions principales ont été observées sur au moins un prélèvement. Les lésions d'hypoplasie sont les plus nombreuses, puis les lésions de calcifications et enfin les lésions de spermiostase. Mais, elles ne représentent qu'une très faible proportion de tubes séminifères même chez les animaux les plus atteints. 4 boucs sur 5 ont des lésions secondaires de fibrose soit 13 prélèvements sur 32. Enfin, 4 boucs sur 5 présentent des lésions secondaires de dégénérescence soit 5 prélèvements sur 32.

La figure 15 présente le nombre moyen de coupes de tubes séminifères présentant des lésions principales pour 1000 coupes de tubes séminifères et le nombre moyen de coupes de tubes séminifères lésés par foyer lésionnel pour chaque bouc. Les animaux les plus atteints à l'examen échographique sont ceux qui ont le plus grand nombre de tubes séminifères lésés. De même, la taille des foyers augmente parallèlement à l'augmentation de l'atteinte échographique.

Bouc	Note échographique	Lésions principales			Lésions secondaires	
		Hypoplasie	Stase spermatique	Calcification	Dégénérescence	Fibrose
S118	A	0	0	0	0/6	0/6
S148	A	0	0	0	0/6	3/6
S149	A	0	0	0	0/6	3/6
S191	A	0	0	0	1/6	2/6
S193	A	0	0	0	1/6	2/6
	<b>Moyenne</b>	0	0	0	<b>Total</b> 2/30	10/30
S519	B	5	0.3	2	0/7	3/7
S309	B	5	1	2	1/6	1/6
S154	B	27	0.3	9	1/6	4/6
S161	C	49	5	23	2/6	0/6
S136	C	23	6	33	1/7	5/7
	<b>Moyenne</b>	21.8	2.5	14	<b>Total</b> 5/32	13/32

Tableau 9: Description quantitative des lésions histologiques : nombre moyen de coupes de tubes séminifères présentant des lésions testiculaires principales pour 1000 coupes de tubes séminifères et nombre de prélèvements présentant des lésions secondaires (nombre/nombre de prélèvements total) pour 5 boucs sains (note A) et 5 boucs atteints de lésions testiculaires (note B: atteinte modérée, note C: atteinte sévère).

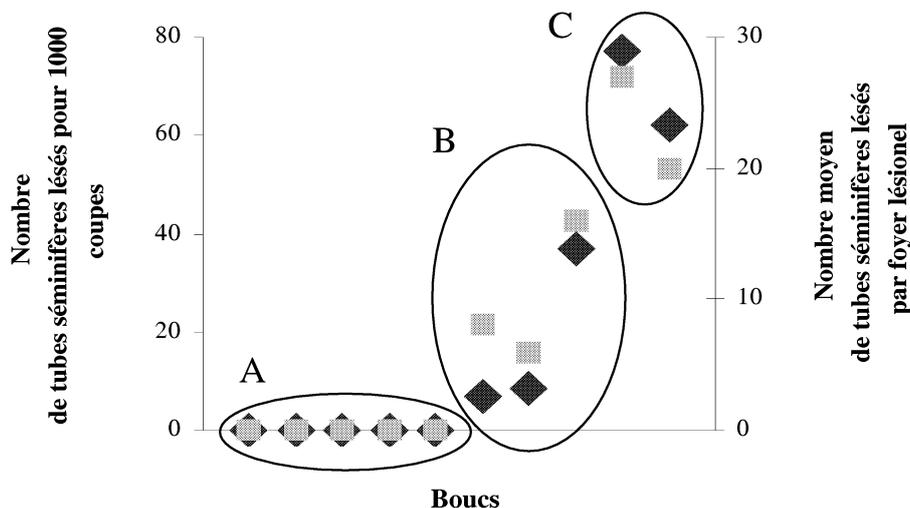


Figure 15 : Comparaison de l'importance des lésions histologiques et de la sévérité des atteintes testiculaires à l'échographie : nombre moyen de coupes de tubes séminifères présentant des lésions histologiques (hypoplasie, stase, calcification) pour 1000 coupes (losange noir) et nombre moyen de coupes de tubes séminifères présentant des lésions histologiques par foyer lésionnel (carré gris) sur 5 boucs sains (groupe A) et 5 boucs présentant des lésions testiculaires à l'examen échographique (B : atteinte modérée, C :atteinte sévère).

## **B- ETUDE ETIOPATHOLOGIQUE**

### **1. Origine alimentaire**

#### **a. Rationnement**

Les tableaux 10 et 11 présentent le calcul de la ration alimentaire distribuée aux 103 animaux de la série S pour les boucs de Capri-IA et les boucs de l'INRA-SEIA.

	<b>Apports ration</b>	<b>Apports recommandés</b>	
		Minimum	Maximum
MS totale	2.93	2.01	2.01
UFL	1.93	1.10	1.26
PDIE (g)	150	61.50	
PDIN (g)	91	61.50	92.30
Cellulose brute (%)	31.30		
Calcium (g)	<b>16.20</b>	5	<b>6.49</b>
Phosphore (g)	4.95	4	

Tableau 10 : Analyse de la ration alimentaire distribuée en 2001-2002 aux boucs de Capri-IA (Larelev 99, Enjalbert ENVV 1989).

	<b>Apports ration</b>	<b>Apports recommandés</b>	
		Minimum	Maximum
MS totale	3.24	2.01	2.01
UFL	1.54	1.10	1.26
PDIE (g)	233	61.50	
PDIN (g)	283	61.50	92.30
Cellulose brute (%)	39.10		
Calcium (g)	<b>43.5</b>	5	<b>6.49</b>
Phosphore (g)	9.8	4	

Tableau 11 : Analyse de la ration alimentaire distribuée en 2001-2002 aux boucs de l'INRA-SEIA (Larelev 99, Enjalbert ENVV 1989).

L'analyse de la ration montre que l'apport calcique est très élevé dans les deux groupes d'animaux (plus de 2 fois les apports maximums recommandés pour Capri-IA et plus de 6 fois pour l'INRA-SEIA). L'analyse de la composition des concentrés montre que pour les deux centres d'insémination, les granulés sont très riches en calcium : 15g/kg MB pour Capri-IA et 26.4g/kg MB pour INRA-SEIA.

### b. Zincémie

Le tableau 12 donne l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes de zinc (moyenne  $\pm$  écart-type) des boucs sains (A), des boucs présentant des zones hyperéchogènes à l'échographie (B: atteinte modérée, C: atteinte sévère) au cours des 4 périodes.

Statut pathologique	Période 1	Période 2	Période 3 Avant l'administration de zinc	Période 4 45 jours après l'administration de zinc
A	10.1 $\pm$ 1.2 7.7-12.5 n=26	9.3 $\pm$ 1.3 6.8-12.5 n=26	8.1 $\pm$ 1.1 6.1-10.1 n=12	9.5 $\pm$ 0.9 8.0-10.6 n=11
B	10.0 $\pm$ 1.6 6.2-13.5 n=65	9.8 $\pm$ 1.6 6.3-14.1 n=63	8.0 $\pm$ 1.1 6.2-10.9 n=36	10.0 $\pm$ 1.0 7.7-11.9 n=37
C	10.7 $\pm$ 1.6 9.2-13.6 n=12	10.0 $\pm$ 1.2 8.4-12.7 n=12	8.8 $\pm$ 1.4 7.1-11.7 n=9	10.4 $\pm$ 1.4 8.7-12.7 n=9

Tableau 12 : Concentrations plasmatiques de zinc ( $\mu\text{mol/L}$ , moyenne  $\pm$  écart-type et rang) chez les boucs des 3 groupes suivants: A (pas d'atteinte testiculaire), B (atteinte testiculaire modérée) et C (atteinte testiculaire sévère) et au cours de 4 périodes, 17/09/01, 14/11/01, avant l'administration de zinc (18/03/02) et 45 jours après l'administration de zinc (02/05/02).

Les zincémies de la première et de la deuxième période sont significativement supérieures à celles de la troisième période (respectivement, 10.1  $\pm$  1.5, 9.7  $\pm$  1.5 et 8.2  $\pm$  1.1  $\mu\text{mol/L}$ , moyenne  $\pm$  ET,  $P < 0.001$ , ANOVA). Les concentrations plasmatiques de zinc de la deuxième période sont supérieures à celles de la première période ( $P = 0.052$ ). Les concentrations plasmatiques de zinc n'ont pas été différentes en fonction de l'atteinte testiculaire ( $P > 0.05$ ).

Les concentrations plasmatiques de zinc ont été significativement augmentées après l'administration parentérale de zinc ( $10.0 \pm 1.1$  versus  $8.2 \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$ , moyenne  $\pm$  ET,  $P < 0.001$ ), mais elles ne diffèrent pas en fonction de l'atteinte testiculaire ( $P > 0.05$ ).

La figure 16 illustre les amplitudes individuelles de l'augmentation de zincémie après injection de zinc en fonction de la zincémie immédiatement avant traitement. L'inspection visuelle de la figure montre que les animaux ayant les zincémies les plus faibles avant traitement sont les animaux qui ont eu les plus fortes augmentations des concentrations plasmatiques de zinc après traitement. L'augmentation des concentrations plasmatiques de zinc après l'administration est inversement corrélée aux concentrations plasmatiques de zinc avant administration ( $R^2 = -0.60$ ).

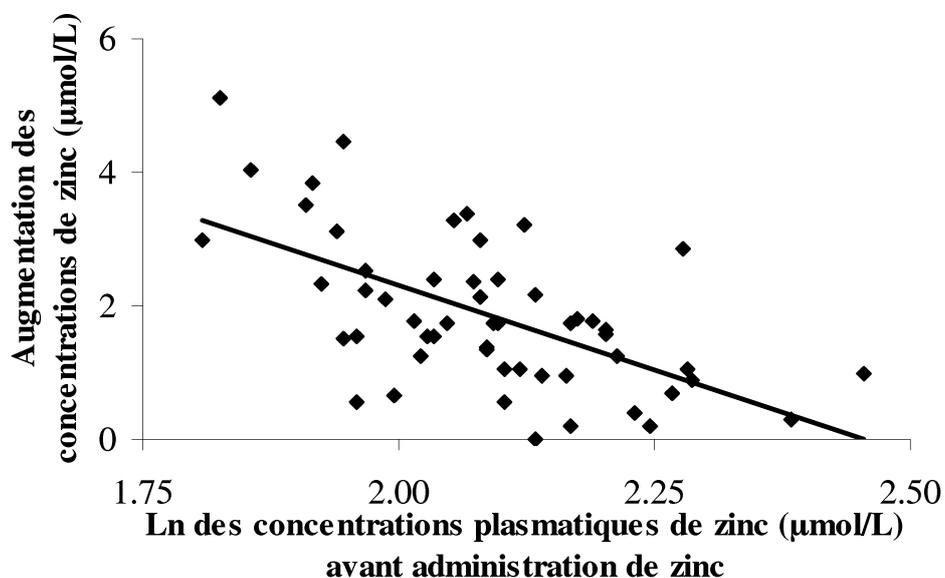


Figure 16 : Amplitudes individuelles des concentrations plasmatiques de zinc ( $\mu\text{mol/l}$ ) 45 jours après administration de Prolontex Zinc<sup>R</sup> en fonction du logarithme népérien des concentrations plasmatiques de zinc ( $\mu\text{mol/l}$ ) immédiatement avant l'administration pour 54 boucs.

## 2. Origine héréditaire

Les tableaux 13 et 14 présentent la répartition des pères et des grands-pères en fonction du pourcentage de boucs atteints dans leur descendance pour les trois séries P, R, S.

<b>Pourcentage de fils présentant des lésions testiculaires</b>	<b>Nombre de pères concernés</b>	<b>Nombre moyen de fils/père (nombre total de fils)</b>
0 à 25 %	4 (9%)	2 (8)
26 à 50 %	6 (13%)	7.3 (44)
51 à 75 %	18 (39%)	6.4 (116)
76 à 99 %	8 (17%)	7.25 (58)
100 %	10 (22%)	3.5 (35)

Tableau 13 : Nombre de pères en fonction du pourcentage de fils présentant des lésions testiculaires (n=261).

<b>Pourcentage de petits-fils présentant des lésions testiculaires</b>	<b>Nombre de grands-pères concernés</b>	<b>Nombre moyen de petits-fils/grand-père (nombre total de petits-fils)</b>
0 à 25 %	2 (7%)	3.5 (7)
26 à 50 %	1 (4%)	39 (39)
51 à 75 %	13 (48%)	11.8 (153)
76 à 99 %	5 (19%)	8.2 (41)
100 %	6 (22%)	3.3 (20)

Tableau 14 : Nombre de grands-pères en fonction du pourcentage de petits-fils présentant des lésions testiculaires (n=261).

La majorité des pères (39%) ou des grands-pères (48%) ont entre la moitié et les trois-quarts de leur descendance qui présentent une atteinte testiculaire à l'examen échographique. Un nombre important de pères (22%) et de grands-pères (22%) ont la totalité de leur descendance atteinte. Par contre, un très faible nombre de pères et de grands-pères (9% et 7% respectivement) ont moins d'un quart de leur descendance atteinte.

L'analyse de variance a mis en évidence un effet père ( $P < 0.02$ ) et un effet grand-père ( $P < 0.001$ ) sur l'apparition des lésions testiculaires dans leur descendance.

## C- ETUDE DES REPERCUSSIONS SUR LA PRODUCTION DE SEMENCE

### 1. Paramètres séminologiques

Les tableaux 15, 16, 17 et 18 présentent les paramètres de production de semence (volume moyen, volume total, nombre de spermatozoïdes moyens, nombre de spermatozoïdes totaux, mobilité moyenne, motilité moyenne) en fonction respectivement, de l'atteinte testiculaire détectée par examen échographique, de la race, de la série et de l'âge à la mise à la reproduction.

<b>Paramètres séminologiques</b>	<b>Atteinte échographique</b>	
	<b>Sains (n=92)</b>	<b>Atteints (n=167)</b>
Volume moyen (ml)	0.81 ± 0.33	0.86 ± 0.43
Volume total (ml)	13.4 ± 6.5	13.2 ± 5.8
Nb spz moyen (x 10 <sup>9</sup> )	3.2 ± 1.3	3.3 ± 1.1
Nb spz totaux (x 10 <sup>9</sup> )	52.7 ± 26.5	52.9 ± 21.8
Mobilité moyenne (%)	38.8 ± 14.4	39.7 ± 12.5
Motilité moyenne (note)	2.1 ± 0.76	2.2 ± 0.64

**Tableau 15** : Paramètres quantitatifs et qualitatifs de production de semence (volume moyen, volume total, nombre de spermatozoïdes moyen, nombre de spermatozoïdes totaux, mobilité moyenne, motilité moyenne) chez 92 boucs sains et 167 boucs présentant une atteinte testiculaire à l'examen échographique, au cours de la période 1999-2001.

<b>Paramètres séminologiques</b>	<b>Race</b>	
	<b>Saanen (n = 115)</b>	<b>Alpin (n = 144)</b>
Volume moyen (ml)	0.84 ± 0.51	0.84 ± 0.28
Volume total (ml)	12.6 ± 6.6	13.9 ± 5.6
Nb spz moyen (x 10 <sup>9</sup> )	3.1 ± 1.3	3.4 ± 1
Nb spz totaux (x 10 <sup>9</sup> )	49.8 ± 26	55.2 ± 21.1
Mobilité moyenne	40.6 ± 14.2	38.4 ± 12.2
Motilité moyenne	2.3 ± 0.73	2.1 ± 0.64

**Tableau 16** : Paramètres quantitatifs et qualitatifs de production de semence (volume moyen, volume total, nombre de spermatozoïdes moyen, nombre de spermatozoïdes totaux, mobilité moyenne, motilité moyenne) chez 115 boucs de race Saanen et 144 boucs de race Alpine.

<b>Paramètres séminologiques</b>	<b>Série</b>		
	<b>P (n = 106)</b>	<b>R (n = 59)</b>	<b>S (n = 94)</b>
Volume moyen (ml)	0.81 ± 0.32	0.79 ± 0.32	0.91 ± 0.50
Volume total (ml)	14.2 ± 6.8	12.7 ± 6.7	12.6 ± 4.5
Nb spz moyen (x 10 <sup>9</sup> )	3.2 ± 1.3	3.2 ± 0.98	3.3 ± 1.1
Nb spz totaux (x 10 <sup>9</sup> )	57.6 ± 28	52.5 ± 22.1	47.7 ± 17
Mobilité moyenne	41.7 ± 13.8	40.5 ± 9.1	36 ± 14
Motilité moyenne	2.3 ± 0.72	2.3 ± 0.41	2 ± 0.73

**Tableau 17** : Paramètres quantitatifs et qualitatifs de production de semence (volume moyen, volume total, nombre de spermatozoïdes moyen, nombre de spermatozoïdes totaux, mobilité moyenne, motilité moyenne) chez 106 boucs de la série P (1999), 59 boucs de la série R (2000) et 94 boucs de la série S (2001).

<b>Paramètres séminologiques</b>	<b>Age (j)</b>					
	<b>200-249 (n = 59)</b>	<b>250-274 (n = 32)</b>	<b>275-299 (n = 37)</b>	<b>300-324 (n = 67)</b>	<b>325-349 (n = 41)</b>	<b>350-374 (n = 23)</b>
Volume moyen (ml)	0.82 ± 0.26	0.84 ± 0.28	0.82 ± 0.27	0.82 ± 0.33	0.83 ± 0.36	0.97 ± 0.93
Volume total (ml)	14.1 ± 5.1	13.7 ± 5.7	13 ± 4.7	13.2 ± 6.5	13.2 ± 8.1	11.5 ± 5.7
Nb spz moyen (x10 <sup>9</sup> )	3.2 ± 0.99	3.2 ± 1.1	3.3 ± 1.1	3.2 ± 1.3	3.5 ± 1.2	3.2 ± 1.4
Nb spz totaux (x10 <sup>9</sup> )	55.4 ± 21.6	52.5 ± 23.1	52.6 ± 19.7	50.6 ± 24.8	56.1 ± 28.1	47.7 ± 22.3
Mobilité moyenne	39.5 ± 12.2	39.1 ± 11.6	38.2 ± 11.2	36.6 ± 15.3	43.5 ± 11.4	42.1 ± 15.5
Motilité moyenne	2.2 ± 0.65	2.3 ± 0.53	2.2 ± 0.50	2 ± 0.80	2.4 ± 0.63	2.3 ± 0.82

**Tableau 18** : Paramètres quantitatifs et qualitatifs de production de semence (volume moyen, volume total, nombre de spermatozoïdes moyen, nombre de spermatozoïdes totaux, mobilité moyenne, motilité moyenne) chez 59 boucs âgés de 200 à 249j, 32 boucs âgés de 250 à 274j, 37 boucs âgés de 275 à 299j, 67 boucs âgés de 300 à 324j, 41 boucs âgés de 325 à 349j et 23 boucs âgés de 350 à 374j à la mise à la reproduction

L'influence de la période, de la série, de l'âge et de la pathologie testiculaire sur les différents paramètres séminologiques a été testée par une analyse de covariance dans un même modèle : elle ne met en évidence aucun effet des quatre facteurs étudiés ou des interactions sur les différents paramètres séminologiques. A noter cependant que le nombre de spermatozoïdes totaux, la note de mobilité moyenne et la note de motilité moyenne diminuent en fonction des séries.

## 2. Anomalies morphologiques des spermatozoïdes

Le tableau 19 présente le pourcentage moyen des spermatozoïdes vivants normaux et anormaux (anomalies de l'acrosome, de la tête, de la pièce intermédiaire, du flagelle, présence de gouttelette cytoplasmique), des spermatozoïdes morts normaux et anormaux, dans deux groupes de boucs, sains et atteints de calcification testiculaire.

Anomalies	Atteinte testiculaire		ANOVA
	Sains (n=5)	Atteints (n=4)	
Vivants normaux	27.4 ± 5.0	24.5 ± 6.9	NS
Morts normaux	6.0 ± 2.9	3.8 ± 1.2	P = 0.17
<b>Total normaux</b>	<b>33.4 ± 6.3</b>	<b>28.4 ± 7.9</b>	<b>NS</b>
Acrosome	5.6 ± 2.3	3.2 ± 0.9	P < 0.05
Tête	1.4 ± 0.8	1.1 ± 0.6	NS
Pièce intermédiaire	7.5 ± 1.7	7.7 ± 2.1	NS
Flagelle	1.2 ± 1.4	0.6 ± 0.4	NS
Gouttelette	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.2	NS
Plusieurs anomalies	3.1 ± 0.9	2.7 ± 1.0	NS
<b>Total vivants anormaux</b>	<b>15.9 ± 3.7</b>	<b>12.8 ± 2.5</b>	<b>P = 0.06</b>
Morts anormaux	49.6 ± 6.4	58.0 ± 7.7	P = 0.06
<b>Total anormaux</b>	<b>65.5 ± 6.3</b>	<b>70.9 ± 7.3</b>	<b>NS</b>
<b>Total morts</b>	<b>55.6 ± 6.9</b>	<b>61.9 ± 6.7</b>	<b>P = 0.12</b>

Tableau 19: Pourcentage de spermatozoïdes normaux, d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes vivants, de spermatozoïdes morts normaux et anormaux (moyenne ± ET) après décongélation de 2 éjaculats obtenus sur 5 boucs sains et 4 boucs présentant une atteinte testiculaire observée à l'examen échographique.

Le pourcentage de spermatozoïdes morts présentant des anomalies morphologiques est plus élevé chez les boucs atteints de lésions à l'examen échographique que chez les boucs sains (58% *versus* 50%, P=0.06). Le pourcentage de spermatozoïdes morts a tendance à être plus élevé chez les animaux atteints (62% *versus* 56%, P=0.12). Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes morts sont donc plus fréquentes chez les animaux présentant une atteinte testiculaire que chez les animaux sains. Nous n'avons pas mis en évidence d'anomalie morphologique spécifique de cette pathologie.



**La calcification testiculaire chez le bouc  
de centres d'insémination artificielle :**  
étude clinique et répercussion  
sur la production de semence.

## **DISCUSSION**

La calcification testiculaire, détectée par échographie, atteint 64% des 259 boucs en première saison sexuelle, de deux centres d'insémination artificielle, sur la période 1999-2001. A l'histologie, le pourcentage de tubes séminifères atteints est relativement faible, de 1 à 8% au maximum. Ces lésions testiculaires pourraient être liées à la carence en zinc mise en évidence sur ces boucs. Une prédisposition génétique pourrait également être impliquée dans cette pathologie. Les répercussions sur la production de semence sont peu importantes; une légère augmentation du pourcentage de spermatozoïdes morts et anormaux a été mise en évidence chez les boucs atteints de calcification testiculaire.

## **A-ETUDE DES LESIONS TESTICULAIRES**

### **1. Examen échographique**

En médecine vétérinaire, l'échographie est largement développée chez la femelle dans le cadre de la maîtrise de la reproduction : diagnostic de gestation, suivi d'ovulation ou détection de pathologies utérines. Elle est moins utilisée chez le mâle où elle peut cependant permettre de détecter différentes pathologies testiculaires.

Les images échographiques du testicule sain ont été décrites par Ahmad et al. en 1991, sur 10 boucs et 5 béliers. Le parenchyme testiculaire est décrit comme une structure homogène et modérément échogène, le rete testis apparaît sous forme d'une ligne hyperéchogène centrale lors de coupe longitudinale. Les enveloppes testiculaires et le scrotum sont facilement mis en évidence sous forme de lignes hyperéchogènes distinctes entourant le parenchyme testiculaire. Une faible quantité de liquide peut être observée de façon physiologique sous forme d'une ligne anéchogène entre les enveloppes testiculaires. Il n'a pas été mis en évidence de calcifications testiculaires sur les animaux examinés.

Cette description est conforme aux images échographiques obtenues par Eilts et al. [1989] sur des testicules de boucs, par Pechman et Eilts [1987] sur des taureaux ainsi qu'aux images que nous avons réalisées sur les testicules de boucs sains au cours de notre étude.

L'examen échographique du testicule permet de diagnostiquer de nombreuses pathologies testiculaires : spermatochèles, hydrochèles, granulomes spermatiques, tumeurs, torsion du cordon spermatique, hernies scrotales, épiddymites. En particulier, les calcifications testiculaires apparaissent sous la forme de foyers hyperéchogènes dans le parenchyme testiculaire [Buckrell 1988, Ahmad et al. 1991, Cartee 1995].

Des calcifications testiculaires sévères ont été mises en évidence par échographie et histologie chez des boucs pubères présentant un problème d'infertilité [Ahmad et al. 1993, Ahmad et Noakes 1995, Gilbert et al. 1995]. Ces animaux présentaient des lésions testiculaires étendues associées dans 3 cas sur 4 à une atteinte de l'épiddyme. Dans tous les cas, une dégénérescence testiculaire était associée à la minéralisation des tubes séminifères.

Eilts et Pechman [1988] ont cherché sur 88 taureaux, âgés de 13 à 31 mois dont 17% présentaient des foyers hyperéchogènes à l'échographie, une relation entre les lésions observées à l'échographie et la qualité de la semence. Ils n'ont pas mis en évidence d'influence de l'âge sur les lésions testiculaires ou de répercussions des lésions sur la qualité de la semence. Barker [1956], au Canada, a observé une fréquence de calcification testiculaire de 30% sur 94 taureaux au total. Suivant les études, la fréquence des lésions de calcification testiculaire varie de 10 à 40% en fonction des espèces [Ladds 1985, Fraser et Wilson 1966].

**Dans notre étude, les lésions testiculaires détectées par examen échographique concernent un pourcentage élevé de boucs de centres d'insémination artificielle (51 à 78% selon les années), supérieur à ce qui est décrit dans la bibliographie.**

L'image échographique surestime l'atteinte réelle du parenchyme testiculaire comparativement à l'examen anatomopathologique (la note 4 correspond environ à 8% des tubes séminifères atteints) mais permet une classification correcte des animaux en fonction de l'importance des lésions. La relation entre le nombre de lésions observées macroscopiquement et à l'examen microscopique et la densité des foyers hyperéchogènes détectés par échographie a été également observée par Ahmad et Noakes [1995]. La répartition des animaux en trois groupes A : aucune atteinte B : atteinte modérée et C : atteinte sévère à partir des notes échographiques est donc un bon reflet des différences lésionnelles du parenchyme testiculaire.

Le suivi échographique sur une période de 3 mois, montre que les lésions sont évolutives : le nombre d'animaux atteints augmentent significativement au fur et à mesure des examens. Chronologiquement, la spermiostase est la première étape de la formation des lésions, suivie par une calcification du matériel cellulaire mort. Les lésions s'étendent ensuite progressivement en amont du tube séminifère.

Au cours 3 années, le pourcentage d'animaux atteints augmente significativement. Les séries sont homogènes car les animaux sont dans des conditions (logement, âge, alimentation, rythme de collecte, première saison sexuelle...) similaires. Les mâles étudiés sont tous issus d'insémination artificielle et donc descendants d'un nombre limité de boucs sélectionnés comme pères à bouc : l'influence génétique mise en évidence dans notre étude explique en partie cette augmentation du nombre de boucs atteints. En effet, si des animaux fortement atteints sont choisis pour engendrer la génération suivante, la prévalence de la pathologie augmente progressivement dans notre population. Cette augmentation pourrait être liée également à l'amélioration de la détection de faibles lésions testiculaires, à l'échographie au cours des années (10% d'animaux notés 1 les deux premières années et 39% la dernière année lors du premier examen).

## **2. Volume testiculaire**

**Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence d'effet de l'âge ou de l'atteinte testiculaire sur le volume testiculaire.**

L'intervalle de 1 mois entre les deux mesures et la période d'étude (animaux en fin de croissance et en saison sexuelle) expliquent l'absence d'effet de l'âge sur le volume testiculaire. En outre, les lésions histologiques ne concernent qu'un nombre réduit de tubes séminifères (<8%), même chez les animaux les plus atteints. Or, une diminution de taille du testicule n'est observée que si la dégénérescence testiculaire est sévère [Blanchard et al. 1991b].

### 3. Histologie

La nature histologique exacte des lésions mises en évidence à l'échographie a été déterminée sur 10 boucs (5 sains, 5 animaux présentant des lésions). La biopsie testiculaire n'a pas été retenue comme technique d'investigation pour deux motifs :

- l'échantillon obtenu ne permet pas toujours d'identifier les lésions, en particulier si la biopsie est réalisée en zone saine comme c'est fréquemment le cas lors de lésions focalisées.
- Les conséquences de la biopsie (cicatrisation, nécrose) sont d'un pronostic défavorable pour la future carrière reproductrice de l'animal. De plus, l'hémorragie provoquée peut entraîner la formation d'anticorps anti-spermatozoïdes et provoquer une réaction inflammatoire [Blanchard et al. 1991b].

**Les lésions mises en évidence à l'histologie sont une stase spermatique dans la lumière des tubes séminifères, les cellules accumulées meurent et se calcifient progressivement. Le tube séminifère atteint dégénère et l'épithélium germinal disparaît. On ne retrouve que des tubes vides où seule la membrane basale persiste. Il y a une réorganisation du tissu avec apparition de fibrose et de dégénérescence testiculaire.** Ces dernières lésions semblent secondaires. Elles peuvent apparaître seules ou associées aux calcifications testiculaires. La coloration de Von Kossa a permis de confirmer que les lésions observées à l'échographie sont bien des calcifications testiculaires. Elle met en évidence les dépôts de calcium grâce à une réaction aux sels d'argent. Nous avons observé qu'une faible proportion de tubes séminifères est calcifiée.

Ces lésions sont similaires à celles décrites dans différentes études [Ahmad et al. 1993, Gilbert et al. 1995, Refsal et al. 1983, Blanchard et al. 1991a] sur des ruminants présentant des problèmes d'infertilité et pour lesquels les lésions concernaient une grande partie du parenchyme testiculaire. La stase spermatique semble être le premier événement conduisant à la formation des lésions [Fraser et Wilson 1966, Barker 1956]. Son origine exacte reste inconnue. Plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- l'existence de canaux borgnes, en doigt de gants, au sein du parenchyme testiculaire qui ne débouchent pas dans le rete-testis comme l'ont montré Hemeida et al. [1978] dans l'épididyme

- une carence en zinc altère le développement testiculaire et la spermatogenèse, entraînant une dégénérescence progressive et la mort des cellules germinales après la méiose. L'accumulation des débris cellulaires dans la lumière des tubes séminifères entraîne leur obstruction [Cigankova et al. 1994, Cigankova et al. 1998].

Dans notre étude, la première hypothèse n'a pas pu être testée, en revanche, nous avons exploré l'hypothèse d'une carence en zinc qui pourrait être à l'origine de la calcification testiculaire.

## **B-ETIOPATHOLOGIE DE LA CALCIFICATION TESTICULAIRE**

### **1. Carence en zinc**

**Nous avons mis en évidence une diminution progressive des concentrations plasmatiques de zinc au cours de la première saison sexuelle. Cette carence en zinc pourrait être associée à des apports excédentaires de calcium dans la ration alimentaire.**

Dans notre étude, les concentrations plasmatiques en zinc sont relativement homogènes sur l'ensemble des boucs. Les valeurs physiologiques des concentrations plasmatiques de zinc ne sont pas clairement définies dans la bibliographie et varient suivant les auteurs. Les concentrations plasmatiques en zinc que nous avons observées, de 8 à 10 $\mu$ mol/L environ sont inférieures à celles rapportées chez des boucs sains (12.8 - 16.9  $\mu$ mol/l) et sont proches de celles mesurées chez des petits ruminants exposés expérimentalement à un déficit en zinc (6.9 - 12.2  $\mu$ mol/l) [Neathery et al. 1973] ou présentant des troubles de la reproduction ou des lésions cutanées (4.9 – 11.5  $\mu$ mol/l) [Nelson et al. 1984, Reuter et al. 1987, McDowell et al. 1991, Rabdeau et al. 2001]. Dans notre étude, les boucs ne présentaient aucune lésion cutanée ou d'autres symptômes associés au déficit en zinc. Cette carence en zinc est largement observée dans les élevages caprins français. En effet, une étude récente sur 35 élevages a montré que 54% des chèvres présentaient une carence en zinc [Rabdeau et al. 2001].

Le zinc est largement distribué dans l'organisme, notamment dans les tubes séminifères où il joue un rôle important dans la spermatogenèse. Dans notre étude, l'apparition des lésions testiculaires est progressive et évolutive avec une augmentation de l'étendue et du nombre de lésions au cours du temps. Cette atteinte testiculaire pourrait être associée à la diminution des concentrations plasmatiques de zinc observées au cours des 6 mois de notre étude. De plus, les élevages caprins français sont largement carencés en zinc en France [Rabreau et al. 2001] ce qui expliquerait les lésions testiculaires observées précocement chez les boucs (environ 14% de boucs atteints à l'âge de 6 mois pour l'année 2000, données non présentées). L'origine de cette carence pourrait être liée à la consommation d'une ration alimentaire largement excédentaire en calcium. Elle pourrait être responsable d'une diminution de l'absorption digestive du zinc car le calcium a la propriété de chélater les minéraux, notamment le zinc. C'est pourquoi, dans la deuxième partie de notre expérience, la supplémentation des animaux en zinc a été réalisée par voie parentérale.

Différents auteurs indiquent que les troubles cliniques liés à un déficit en zinc sont difficiles à diagnostiquer par des méthodes biochimiques et que la réponse clinique à une supplémentation en zinc constituerait la meilleure preuve du déficit en zinc [Nelson et al. 1984, Reuter et al. 1987]. Par conséquent, l'augmentation des concentrations plasmatiques de zinc 45 jours après l'administration, notamment chez les animaux présentant des concentrations en zinc faibles avant administration, est un élément en faveur d'un déficit en zinc chez les boucs de centres d'insémination artificielle.

Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre les concentrations plasmatiques de zinc et l'importance des zones hyperéchogènes dans le parenchyme testiculaire. L'expression clinique associée au déficit en zinc est variable suivant les animaux et les lésions de calcification testiculaire pourraient apparaître plus tardivement chez nos animaux sains. Une échographie testiculaire à un âge plus avancé nous permettrait de tester cette hypothèse. En outre, d'autres facteurs pourraient être à l'origine de la dégénérescence testiculaire, tels que l'origine génétique des animaux.

## **2. Influence génétique**

**L'analyse des filiations a mis en évidence un effet de l'origine génétique sur l'atteinte testiculaire. En effet, 22% des pères ou grands-pères ont 100% de leurs fils/petits-fils atteints de calcification testiculaire.**

Aucune corrélation entre les zincémies et l'atteinte testiculaire n'a pu être établie. D'autres facteurs, tels que l'origine génétique des animaux, pourraient intervenir dans l'expression de cette pathologie. Cette hypothèse est renforcée par la différence du pourcentage de boucs atteints entre la race Alpine et la race Saanen (respectivement, 71% et 56% des mâles présentent des lésions testiculaires).

A notre connaissance, aucune étude génétique n'a été menée sur cette pathologie. Pour confirmer l'implication d'une prédisposition héréditaire dans cette pathologie, il serait intéressant de poursuivre l'étude sur plusieurs générations afin de connaître le statut des pères et des grands-pères vis-à-vis de la pathologie et pouvoir le comparer à celui de leur descendance. De plus, un plus grand nombre d'animaux permettrait de calculer l'héritabilité de cette pathologie.

## **C- REPERCUSSIONS SUR LA PRODUCTION DE SEMENCE**

### **1. Paramètres séminologiques**

**Sur notre population de boucs jeunes, la calcification testiculaire n'a pas de répercussion majeure sur la quantité et la qualité de la semence.**

Au cours de notre étude, la production spermatique de l'ensemble des animaux étudiés a été conforme aux données bibliographiques pour des animaux sains :

- volume (moyenne  $\pm$  ET) :  $0.84 \pm 0.40$  ml (0.5 à 2ml)
- concentration (moyenne  $\pm$  ET) :  $2.72 \pm 0.47 \cdot 10^9$  spz/ml (1.5 à  $4 \cdot 10^9$  spz/ml) [Refsal 1986].

Différentes études [Ahmad et al. 1993, Ahmad et Noakes 1995, Gilbert et al. 1995, Refsal et al. 1983] sur des boucs atteints de dégénérescence testiculaire associée à des calcifications des tubes séminifères ont montré une dégradation importante de la qualité de la semence : volume et concentration diminués pouvant aller jusqu'à l'azoospermie, diminution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles (<20%), de la motilité massale (note <1) et augmentation du pourcentage de spermatozoïdes morts et/ou anormaux. Les examens échographiques et histologiques des testicules de ces animaux ont mis en évidence une atteinte très importante du parenchyme testiculaire, jusqu'à 70% de l'organe atteint. A l'opposé, deux études [Eilts et Pechman 1988, Barker 1956] sur des taureaux dont 17 et 30% respectivement présentaient des foyers hyperéchogènes à l'échographie n'ont pas mis en évidence de répercussions sur la production de semence.

Les conséquences des calcifications testiculaires, isolées ou accompagnant une dégénérescence testiculaire, varient en fonction de l'extension et du nombre de tubes séminifères affectés [Blanchard et al. 1991b, Fraser et Wilson 1966]. C'est pourquoi les répercussions sur la production de semence ne sont perceptibles que lorsqu'une proportion importante du parenchyme testiculaire est atteinte ce qui n'est pas le cas des boucs inclus dans notre étude.

## **2. Anomalies spermatiques**

**L'étude des anomalies morphologiques a mis en évidence une augmentation des spermatozoïdes morts anormaux chez les boucs atteints de lésions testiculaires par rapport aux boucs témoins. Aucune anomalie morphologique particulière n'est associée à cette pathologie.**

Les conséquences précoces d'une atteinte testiculaire (dégénérescence et/ou calcification) se manifestent le plus souvent par une altération de la qualité des éjaculats avec en particulier une augmentation des spermatozoïdes anormaux. Les anomalies morphologiques les plus fréquemment rencontrées dans cette pathologie sont : des têtes détachées, des queues enroulées, des pièces intermédiaires retournées ainsi que la présence de cellules anormales (cellules spermatiques rondes, cellules géantes, méduses ou multinuclées) [Blanchard et al. 1991b].

Des éjaculats de boucs atteints de calcification testiculaire peuvent contenir jusqu'à 85% de spermatozoïdes morts, dont 59% présentent des anomalies avec une majorité de têtes piriformes, de queues anormales ou absentes, de gouttelettes cytoplasmiques proximales et de têtes détachées [Ahmad et Noakes 1995, Ahmad et al. 1993].

Notre étude sur les anomalies spermatiques a été réalisée sur des semences de boucs décongelées, ce qui explique le pourcentage élevé de spermatozoïdes anormaux et morts, même chez les animaux témoins. Nous n'avons pas mis en évidence de relation entre une anomalie spermatique particulière et l'atteinte testiculaire. En effet, les processus de congélation/décongélation altèrent les cellules : les cellules anormales, déjà fragilisées meurent d'où une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes morts chez les boucs atteints de lésions testiculaires. Cependant, l'augmentation du nombre de spermatozoïdes morts anormaux chez les boucs atteints de calcification testiculaire pourrait refléter les répercussions de la carence en zinc des animaux étudiés, sur les processus physiologiques de spermatogenèse ou de la maturation.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Nous avons mis en évidence des lésions de calcification testiculaire chez 64% des 259 boucs de centres d'insémination artificielle, âgés de moins de 1 an lors de leur première saison sexuelle. A l'examen échographique, ces lésions apparaissent sous forme de foyers hyperéchogènes dans le parenchyme testiculaire. Le pourcentage d'animaux atteints a augmenté de 51% à 78% entre 1999 et 2001.

A l'histologie, ces lésions concernent 1 à 8% des tubes séminifères et sont caractérisées par une stase spermatique dans la lumière des tubes séminifères. Les spermatozoïdes accumulés meurent et se calcifient progressivement. L'épithélium germinal dégénère et on ne retrouve que des tubes vides. Ces lésions s'accompagnent de fibrose et de dégénérescence testiculaire.

Ces lésions de calcification testiculaire pourraient être consécutives à une carence en zinc. En effet, les concentrations plasmatiques en zinc chez les boucs étudiés sont relativement faibles par rapport aux valeurs physiologiques et elles diminuent significativement au cours du temps. L'augmentation des concentrations plasmatiques 45 jours après l'administration de zinc est également en faveur d'un déficit en zinc. En outre, les boucs ont reçu des apports alimentaires en calcium 3 à 6 fois supérieurs à leurs besoins. Cet excès de calcium pourrait entraîner une carence secondaire en zinc par défaut d'absorption. Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre les concentrations plasmatiques en zinc et l'importance des zones hyperéchogènes dans le parenchyme testiculaire. Un facteur génétique pourrait intervenir dans le degré d'expression de cette pathologie et pourrait constituer un facteur prédisposant au développement des lésions de calcification testiculaire.

Cette pathologie testiculaire a peu de répercussions sur la qualité et la quantité de semence récoltée chez les jeunes boucs, sans doute en raison de la faible proportion de tubes séminifères atteints. Cependant, nous avons mis en évidence une légère augmentation des spermatozoïdes morts anormaux chez les boucs atteints de calcification testiculaire. Le suivi des boucs sur une période plus longue permettrait d'explorer les répercussions de cette pathologie chez des boucs plus âgés.

L'ensemble de ces résultats pourrait conduire les centres d'insémination artificielle à modifier la ration alimentaire des boucs. En particulier, la quantité de calcium contenue dans les granulés pourrait être diminuée. Pour confirmer l'hypothèse selon laquelle la carence en zinc est à l'origine des lésions testiculaires observées, une étude pourrait être menée sur des boucs expérimentalement carencés en zinc.

Il serait également intéressant de prendre en compte l'importance des lésions testiculaires dans les critères de sélection des pères à boucs et d'éliminer les mâles les plus atteints. Cependant, une telle modification du schéma de sélection nécessite la confirmation de l'intervention d'un facteur génétique sur la survenue de lésions testiculaires sur un plus grand nombre d'animaux et sur plusieurs générations.

**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, P. DESNOYERS, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

**Mlle GUILLOT Julie**

a été admis(e) sur concours en : 1997

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 12 juillet 2002

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussignée, N. HAGEN-PICARD, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, autorise la soutenance de la thèse de :

**Mlle GUILLOT Julie**

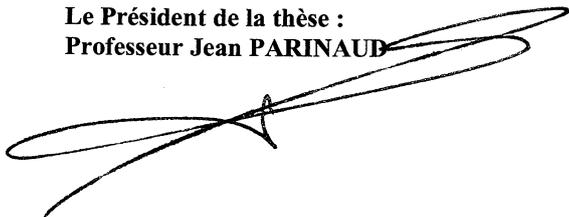
intitulée :

*«La calcification testiculaire chez les boucs de centre d'insémination artificielle : étude clinique et répercussion sur la production de semence.»*

**Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Nicole HAGEN-PICARD**



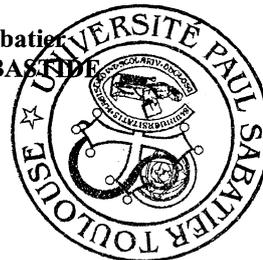
**Vu :  
Le Président de la thèse :  
Professeur Jean PARINAUD**



**Vu :  
Le Directeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Pierre DESNOYERS**



**Vu le : 10 SEP. 2002  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier  
Professeur Raymond BASTIEN**





## **BIBLIOGRAPHIE**

- **Ahmad N. et al.** B-mode real time ultrasonographic imaging of the testis and epididymis of sheep and goats. *Vet. Records* 1991, **128** : 491-496.
- **Ahmad N. et al.** Use of ultrasound to diagnose testicular degeneration in a goat. *Vet. Record* 1993, **132** : 436-439.
- **Ahmad N. Noakes DE.** Ultrasound imaging in determining the presence of testicular degeneration in two male goats. *Br. Vet. J.* 1995, **151** : 101-110.
- **Arnaud J. Favier A.** Le zinc In : Chappuis P. Les oligoéléments en médecine et biologie. Paris Ed. Lavoisier 1991 : 347-397.
- **Barker CAV.** Some observation on testicular calcification in bulls. *Canadian J. of Comparative Med. and Vet. Sci.* 1956, **20** : 37-50.
- **Barone R.** Chap. 2: Appareil génital mâle In: Barone R. Anatomie des mammifères domestiques Tome 3 Fascicule II: Appareil uro-génital. Lyon Ed. Laboratoire d'anatomie ENV. 1978 : 90-268.
- **Bishop MNH. et al.** Semen characteristics and fertility in the bull. *J. Agri. Sci.* 1954, **44** : p227.
- **Blanchard TL. et al.** The cause and pathologic changes of testicular degeneration in large animals. *Food-Animal Practice* 1991a : 531-536.
- **Blanchard TL. et al.** Testicular degeneration in large animals : identification and treatment. *Food-Animal Practice* 1991b : 537-542.
- **Bonnes G. et al.** Reproduction des mammifères d'élevage. Paris Ed. Foucher 1988 : 239p.
- **Boué P. Corteel JM.** Aptitude of male goat sperm to withstand freezing : combined effects of season and time of sexual rest between two successive semen collections. Recent Advances in Goat productions. Proceedings of and papers presented at the 5<sup>th</sup> Int. Conf. On Goats, Lokeshar RR. New Delhi, Mars 1992: 1042-1045.
- **Brice G. et al.** L'insémination artificielle chez les petits ruminants. *Le Point Vétérinaire* 1997, **185**: 43-49.
- **Buckrell BC.** Applications of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. *Theriogenology* 1988, **29**: 71-84.
- **Capri-IA** Statistiques 2000 Espèce caprine *Elevage et Insémination* 2000 : 65-69.
- **Cartee RE.** The reproductive system : the testicles and epididymis In : Cartee RE. et al. Practical Veterinary Ultrasound Philadelphia Ed. A Lea and Febiger Book, A Waverly Company 1995 : 259-260.

- **Chatelain E.** Atlas d'anatomie de la chèvre *Capra hircus* L. Versailles Ed. INRA Publications 1987 : p151.
- **Chemineau P. Delgadillo JA.** Neuroendocrinologie de la reproduction chez les caprins. *INRA Prod. Anim.* 1994, **7** : 315-326.
- **Cigankova V. et al.** Morphological structure of bull testes at zinc deficiency and effect of the application of ZINDEP inj. on the spermatogenesis recovery. *Slov. Vet. Cas.* 1994, **19** : 134-138.
- **Cigankova V. et al.** Morphological structure of the testes in stallions at zinc deficiency. *Slov. Vet. Cas.* 1998, **23** : 97-100.
- **Corteel JM.** Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal : effet du glucose. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 1974, **14**: 741-745.
- **Corteel JM. et al.** Voies disponibles pour augmenter l'utilisation des meilleurs boucs. 4<sup>ème</sup> Journée Rech. Ovine et Caprine INRA-ITOVIC Paris, Novembre 1978: 358-366.
- **Corteel JM.** Collection, processing and artificial insemination of goat semen. In : Gall C. Goat Production Londres Ed. Academic Press Inc. 1981: 171-191.
- **Corteel JM.** Quelques aspects de la reproduction des caprins. Rapport préparé pour le colloque sur l'utilisation et l'amélioration du cheptel caprin polonais. Jastrzebiec, Novembre 1994: 4-23.
- **Dadoune JP. Demoulin A.** Chap. 13: Structure et fonctions du testicule In : Thibault C. Levasseur MC. La Reproduction chez les Mammifère et l'Homme Paris Ed. INRA 2001 : 256-289.
- **Delgadillo Sanchez JA.** Abolition des variations saisonnières de l'activité sexuelle chez le bouc par des traitements photopériodiques. Th. D. Physiologie, Biologie des organismes et des populations Montpellier, Université des sciences et techniques du Languedoc. 1990: 119p.
- **Derashri et al.** Reproduction in bucks, spermatogenesis, duration of seminiferous epithelium cycle and germ cells degeneration. Pre-Conference Proceedings, Abstract of Contributory Paper. 5<sup>th</sup> Inter. Conf. on Goats, New-Delhi, Mars 1992, vol I : p263.
- **Derivaux J. Ectors F.** Reproduction chez les animaux domestiques Louvain-la-Neuve Ed. Cabay 1985: 1141p.
- **Desarkar S. et al.** Aetio-pathological and biochemical changes in the testes of slaughtered goats. *Indian J. Anim. Sci.* 1990, **60** : 166-168.
- **Eilts BE. Pechman RD.** B-mode ultrasound observations of bull testes during breeding soundness examinations. *Theriogenology* 1988, **30** : 1169-1175.

- **Eilts BE. et al.** Ultrasonographic evaluation of induced testicular lesions in male goats. *Am. J. Vet. Res.* 1989, **50** : 1361-1364.
- **Fernandez C. et al.** Une association fortuite? *Ann. Path.* 2001, **21** : 175-176.
- **Fraser AF. Wilson JC.** Testicular calcinosis in domestic ruminants. *Nature* 1966, **210** : p547.
- **Fraser AF.** Infertility in goat related to testicular atrophy. *Trop. Anim. Hlth Prod.* 1971, **3** : 173-182.
- **Gilbert JO. et al.** Ultrasonography to diagnose testicular lesion in an infertile Angora buck. *Irish Vet. J.* 1995, **48** : 416-418.
- **Hemeida NA. et al.** Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull and stallion. *Am. J. Vet. Res.* 1978, **39** : 1892-1900.
- **Ladds PW.** Chap. 5: The male genital system : testicular degeneration. In : Jubb KVF. et al. *Pathology of domestic animals* 4<sup>ième</sup> édition. San diego Ed. Academic Press Inc. 1985: 428-432.
- **Lamand M.** Place du laboratoire dans le diagnostic des carences en oligo-éléments chez les ruminants. *Rec. Med. Vet.* 1987, **163** : 1071-1082.
- **Leboeuf B. et al.** L'insémination artificielle et l'amélioration génétique chez la chèvre laitière en France. *INRA Prod. Anim.* 1998a, **11** : 171-181.
- **Leboeuf B. et al.** Artificial insemination of dairy goats in France. *Livestock Prod. Sci.* 1998b, **55** : 193-203.
- **Leboeuf B. et al.** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, **62** : 113-141.
- **McDowell LR. et al.** Mineral status comparisons in goats of Florida, with emphasis on zinc deficiency. *Small Rum. Res.* 1991, **5** : 327-335.
- **Memon MA.** Male infertility. *Vet. Clin. North Am. : Large An. Practice* 1983, **5** : 619-635.
- **Mickelsen W. Memon MA.** Infertility and diseases of the reproductive organs of bucks. In : Youngquist R. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* Philadelphie Ed. WB. Saunders Company 1997: 489-493.
- **Mills CF. et al.** Zinc deficiency and the zinc requirements of calves and lambs. *Br. J. Nutr.* 1967, **21** : 751-768.
- **Neathery MW. et al.** Effects of a long term zinc deficiency on feed utilization, reproductive characteristics, and hair growth in the sexually mature male goat. *J. Dairy Sci.* 1973, **56** : 98-105.

- **Nelson DR. et al.** Zinc deficiency in sheep and goats : three field cases. *JAVMA* 1984, **184** : 1480-1485.
- **Nève J.** Oligoéléments en thérapeutique : maladies endocrinologiques In : Chappuis P. Favier A. Les oligoéléments en nutrition et thérapeutique Paris ED. Lavoisier 1995 : p221.
- **Oddo F. et al.** La microlithiase testiculaire, affection bénigne à surveiller. *La Presse Médicale* 1998, **34** : 1763.
- **Paragon BM.** Sels minéraux et alimentation des ruminants Ed. Compagnies des salins du midi et des salines de l'est 1995 : 80p.
- **Pechman RD. Eilts BE.** B-mode ultrasonography of the bull testicle. *Theriogenology* 1987, **27** : 431-441.
- **Pellicer-Rubio MT. Combarrous Y.** Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extender as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J. Reprod. Fertil.* 1998, **112** : 95-105.
- **Rabdeau I. et al.** Zinc et cuivre dans la plasma des chèvres en lactation : relation avec les troubles cutanés et le niveau de production. *Bull. GTV* 2001, **11** : 341-345.
- **Refsal KR. et al.** Testicular degeneration in a male goat : a case report. *Theriogenology* 1983, **19** : 685-691.
- **Refsal KR.** Collection and evaluation of caprine semen. In : Morrow DA. Current Therapy in Theriogenology<sup>2</sup> Philadelphie Ed. WB. Saunders Company 1986 : 619-621.
- **Reuter R. et al.** Zinc responsive alopecia and hyperkeratosis in Angora goats. *Aus. Vet. J.* 1987, **64** : 351-352.
- **Smith MC.** Infertility in the buck In : Morrow DA. Current Therapy in Theriogenology<sup>2</sup> Philadelphie Ed. WB. Saunders Company 1986 : 622-624.
- **Smith MC. Sherman DM.** Chap 13 : Reproductive system : the Buck In : Smith MC. Sherman DM. Goat Medicine Philadelphie Ed. A Lea and Febiger Book, A Waverly Company 1994 : 439-451.
- **Stevens A. Lowe J.** Chap. 17: Appareil génital masculin In : Stevens A. Lowe J. Histologie Paris Ed. Pradel 1993 : 304-321.
- **Takkar GL. et al.** Calcification of the seminiferous tubules of the rat testis after cadmium administration : prevention by zinc and selenium. *Acta. Biol. Med. Germ.* 1968, **20** : 97-102.
- **Tarigan S. et al.** Genital pathology of feral male goats. *Aust. Vet. J.* 1990, **67** : 286-290.
- **Watt DA.** Testicular pathology of merinos rams. *Aust. Vet. J.* 1978, **54** : 473-478.

## ANNEXES

### **1. Préparation d'une solution de formol tamponné à 10%**

#### **A. MODE OPERATOIRE**

Pour 25 litres :

- 2.5 litres de formaldéhyde
- 22.5 litres d'eau
- 100 grammes de phosphate de sodium monobasique
- 162.5 grammes de sodium phosphate dibasique
- 100 ml de soude 4N

## 2. Coloration à l'hémalun-éosine

### A. MODE OPERATOIRE

#### Première étape : déparaffinage

- 5 minutes dans le toluène

#### Seconde étape : réhydratation

- 5 minutes dans l'alcool absolu
- 5 minutes dans l'alcool à 95°
- 5 minutes sous l'eau du robinet
- éponger les lames

#### Troisième étape : coloration et montage

- 1 minute dans le colorant hémalun (colorant nucléaire)
- rincer à l'eau : ajouter 3 gouttes d'ammoniaque et laisser couler l'eau
- nettoyer les contours avec du papier
- 20 secondes dans le colorant éosine ; rincer en faisant des bains rapides
- l'alcool à 95° décolore l'éosine, laisser assez longtemps si les lames sont trop roses.
- passage à l'alcool absolu
- toluène
- effectuer le montage des lames avec du baume.

### B. RESULTATS

- les noyaux sont colorés en bleu.
- les cytoplasmes sont colorés en rose.

### C. COLORANTS

- hémalun de MAYER : réactif de RAL
- éosine à 2 % : éosine jaunâtre 1 g, érythrosine 1 g, eau distillée 100 ml.

### 3. Coloration au Trichrome de Masson

#### A. PRINCIPE

C'est une coloration associant : une coloration nucléaire par l'hémalum (ou mieux la trioxyhémateïne ou l'hématoxyline lente), une coloration cytoplasmique par un mélange de colorants acides : Fushine acide + ponceau de xylidine ; et une coloration élective du collagène par un autre colorant acide : bleu d'aniline ou vert lumière.

#### B. MODE OPERATOIRE

- 1 – Déparaffinage, hydratation
- 2 – Coloration nucléaire par l'hématoxyline de harns préalablement filtrée; lames plongées dans l'hématoxyline **4 minutes** ; les coupes doivent être brunes, pas trop foncées.
- 3 – Rinçage dans deux bains d'eau ordinaire.
- 4 – Plonger les lames dans un bain d'eau légèrement ammoniacué quelques secondes. Les coupes sont colorées en bleu.
- 5 – Rincer à l'eau. Nettoyer les lames si nécessaire puis passer dans l'eau distillée.
- 6 – Coloration des cytoplasmes par le mélange Fushine Ponceau (1 volume de fushine pour 2 volume de Ponceau de xylidine). Plonger les lames **6 minutes** dans le mélange Fushine Ponceau
- 7 – Rinçage dans 2 bains d'eau ordinaire (surtout pas d'eau distillée)
- 8 – Mettre dans un bain d'acide phosphomolybdique à 1 % pendant **1 minute à 1 minute et demi**. Ne pas rincer.
- 9 – Coloration du collagène par le bleu d'aniline ou le vert lumière
  - 6 minutes** pour le bleu d'aniline
  - 5 minutes** pour le vert lumière
- 10 – Rincer à l'eau distillée
- 11 – Passage dans un bain d'eau acidifiée à 1% pendant **1 à 2 minutes** en fonction de l'intensité de la coloration par le bleu d'aniline, souhaitée.

12 – Passer assez rapidement dans des bains successifs d'alcool à 95 ou 100° pour déshydrater.

13 - Passage au toluène, monter au baume.

## **C. RESULTATS**

Les noyaux sont bleus noirs ou bruns selon le colorant utilisé. Les cytoplasmes sont roses à rouges. Le collagène, le mucus, la substance interstitielle du cartilage et de l'os sont bleus ou verts.

## **D. COLORANTS**

- Fushine acide : 1 gramme + 100 ml d'eau distillée + 0.5 ml d'acide acétique.
- Ponceau de xylydine : 1 gramme + 100 ml d'eau distillée + 0.5 ml d'acide acétique.
- Mélange Fushine acide + Ponceau de xylydine : 1 volume de Fushine acide et 2 volumes de Ponceau de xylydine.
- Bleu d'aniline : 1 gramme + 100ml d'eau distillée + 0.5 ml d'acide acétique.
- Vert lumière : 1 gramme + 100 ml d'eau distillée + 0.5 ml d'acide acétique.

## 4. Coloration de Von Kossa

### A. PRINCIPE

On cherche à mettre en évidence le calcium. La coupe est traitée par une solution de nitrate d'argent. Le cation métallique lourd se substitue au  $Ca^{++}$  et il ne reste plus, dans un second temps qu'à révéler le sel d'argent ainsi obtenu en le réduisant en argent métallique.

### B. MODE OPERATOIRE :

La coupe déparaffinée est amenée à l'eau distillée.

- 1 – Placer dans une solution de  $AgNO_3$  à 5 % à l'obscurité pendant **30 minutes (à 1 heure)**.
- 2 – Rincer soigneusement à l'eau distillée.
- 3 – Exposer soit à la lumière soit à une source de rayons UV pendant **3 heures**
- 4 – Coloration nucléaire facultative pendant **3 minutes**
- 5 – Rincer à l'eau, passage à l'alcool toluène et montage au baume.

### C. RESULTATS

Les sites contenant des sels de calcium sont recouverts par un précipité noir intense.

Toulouse, 2002

NOM : GUILLOT

PRENOM : JULIE

TITRE : LA CALCIFICATION TESTICULAIRE CHEZ LES BOUCS DE CENTRES D'INSEMINATION ARTIFICIELLE : ETUDE CLINIQUE ET REPERCUSSION SUR LA PRODUCTION DE SEMENCE.

RESUME :

La calcification testiculaire a été étudiée chez 259 jeunes boucs de 2 centres d'insémination artificielle (CAPRI-IA et INRA-SEIA), en première saison sexuelle. A l'examen échographique des testicules, les lésions apparaissent comme des foyers hyperéchogènes plus ou moins nombreux dans le parenchyme testiculaire. Le pourcentage de boucs atteints augmente de 51% à 78% entre 1999 et 2001 et est plus élevé dans la race Alpine (71%) que dans la race Saanen (56%). Il n'y a pas d'influence de l'âge des animaux sur l'atteinte testiculaire. A l'histologie, 1 à 8% des tubes séminifères sont atteints et présentent une stase spermatique et une hypoplasie de l'épithélium germinal. Les spermatozoïdes accumulés meurent puis se calcifient progressivement. Ces lésions s'accompagnent de fibrose interstitielle et de dégénérescence testiculaire. Ces calcifications testiculaires pourraient être associées à une carence en zinc. En effet, les concentrations plasmatiques en zinc mesurées chez les boucs sont faibles et diminuent significativement au cours des 6 mois de la période d'étude. Elles ne diffèrent pas suivant le statut pathologique des animaux. L'administration intramusculaire de zinc a permis de rétablir au moins partiellement les concentrations plasmatiques initiales, ce qui est en faveur d'un déficit en zinc. De plus, les apports alimentaires en calcium sont trop élevés et pourraient diminuer l'absorption du zinc. L'influence des pères et des grands-pères sur le statut pathologique de leurs descendants suggère qu'un facteur génétique pourrait jouer un rôle prédisposant dans le développement des lésions testiculaires. Les lésions ont peu de répercussions sur la quantité et la qualité de la semence récoltée, en raison probablement de la faible proportion de tubes séminifères lésés chez ces animaux.

MOTS-CLES : bouc, testicule, calcification, échographie, histologie, zincémie / fertilité / c.

ENGLISH TITLE : TESTICULAR CALCINOSIS IN BUCKS OF ARTIFICIAL INSEMINATION CENTERS : CLINICAL STUDY AND REPERCUSSION ON SEMEN PRODUCTION.

ABSTRACT :

Testicular calcinosis has been studied in 259 young bucks of 2 artificial insemination centers (CAPRI-IA et INRA-SEIA), in the first sexual breeding season. Ultrasonographically, lesions correspond to dense hyperechoic areas, more or less numerous, in the testicular parenchyma. Affected bucks percentage varied from 51% to 78% between 1999 and 2001. Alpines male goats are more affected than Saanen male goats (71% versus 56%). Age of bucks has no influence on testicular calcinosis. Histologic changes affect 1 to 8% of seminiferous tubules and include spermiostasis, seminiferous epithelium desquamations and mineralization of dead spermatozoa. Fibrosis and testicular degeneration are also observed. The cause of testicular calcinosis may be a zinc deficiency. Bucks plasma zinc concentrations are low and decrease significantly during the 6 months study. There is no zinc concentration differences depending on testicular calcinosis degree. Zinc administration has partially restored plasma zinc concentrations, reinforcing the hypothesis of zinc deficiency. Moreover, dietary calcium intake is too high and could interfere with the zinc absorption. Father and grandfather influence on their descendants suggests that an hereditary factor could play a predisposing role in testicular calcinosis. Lesions are low repercussions on semen quality and quantity, maybe because of the little percentage of affected seminiferous tubules.

KEY WORDS : buck, testis, calcinosis, ultrasonography, histology, zinc