

INFLUENCE DE L'EPIDIDYMITE CONTAGIEUSE DUE A *BRUCELLA OVIS* SUR LA FERTILITE DES BELIERS

Synthèse des résultats de l'expérimentation conduite par la FRGDS PACA en partenariat avec l'ENVT et l'ANSES

Sommaire

I.	Introduction.....	1
II.	Matériel et méthodes.....	2
II.1.	Examen physique et collecte de sperme	2
II.2.	Analyse des données	2
III.	Résultats et discussion	5
III.1.	Résultats de l'examen clinique	5
III.2.	Résultats des analyses sérologiques.....	5
III.3.	Résultats des analyses bactériologiques	6
III.4.	Note de qualité du sperme	7
III.5.	Relations entre sérologie, qualité du sperme et excrétion	7
III.6.	Relation entre présence de lésions, sérologie, qualité du sperme et excrétion	10
IV.	Valorisation des résultats et plan de lutte	13
IV.1.	Limites de l'étude	13
IV.2.	Sérologie et palpation : deux outils pertinents	13
IV.3.	Recommandations pour une réforme orientée	14
V.	Conclusion	15
	Bibliographie	16

I. Introduction

Brucella ovis (*B. ovis*) est une bactérie Gram négative, considérée comme la cause infectieuse majeure des problèmes de reproduction chez les ovins en zone indemne de brucellose. Elle est responsable d'épididymites et d'une diminution de la fertilité chez le bélier. Elle peut entraîner occasionnellement chez les femelles des avortements associés à une placentite ou encore des mises-bas prématurées. Mais généralement, cette affection entraîne peu de signes cliniques et peut passer inaperçue dans un troupeau. Les lésions sont localisées au niveau du tractus génital du bélier, notamment à l'épididyme, mais peuvent atteindre les testicules ou les glandes séminales.

La transmission de la maladie est directe entre mâles, par voie vénérienne ou par contact oro-génital. La transmission entre béliers peut être indirecte si les béliers ont sailli les mêmes brebis pendant la saison sexuelle. Après l'infection, la majorité des mâles reproducteurs continuent à excréter *B. ovis* dans leur semence pendant 2 à 4 ans, alors que l'infection des brebis reste transitoire. Ainsi, les femelles ne sont pas considérées comme un élément épidémiologique majeur de cette maladie, excepté leur rôle dans la transmission de l'infection d'un bélier à un autre par la saillie.

En Région PACA, l'observation d'une forte séroprévalence (plus de 50%) dans un effectif de jeunes béliers en 2008 et 2009 a entraîné un dépistage sérologique chez les béliers à l'échelle de la Région. En 2011, le taux d'infection des cheptels (au moins 1 bélier séropositif dans un troupeau) variait de 5,5 % dans les Hautes-Alpes à 53 % dans les Bouches-du-Rhône. L'arrêt de la vaccination des agnelles et des béliers à l'aide du vaccin Rev.1 en 2008 (vaccin vivant atténué contre la brucellose, qui protège également contre l'infection des béliers à *B. ovis*), explique probablement la recrudescence de cette pathologie.

A l'initiative de la FRGDS PACA, une étude a été conduite en partenariat avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) et le Laboratoire de Santé Animale de Maisons-Alfort (ANSES) afin d'évaluer, dans les troupeaux infectés, la relation entre l'infection par *B. ovis* (déterminée par la séropositivité des béliers) et la fertilité *a priori* de ces mêmes béliers (estimée par l'examen clinique de l'appareil génital et les caractéristiques de la semence).

Un deuxième aspect visait à mesurer l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme (bactériologie et PCR) en fonction du statut sérologique individuel des animaux.

Le but final était de pouvoir améliorer les connaissances sur la maladie et pouvoir proposer un plan de réforme des béliers aux éleveurs.

II. Matériel et méthodes

II.1. Examen physique et collecte de sperme

Du 10 au 14 septembre 2012, 218 béliers issus de 11 troupeaux de la région PACA (2 troupeaux du Alpes-de-Haute-Provence, 7 des Bouches-du-Rhône, 1 du Vaucluse et 1 du Var) ont été analysés. Tous les troupeaux avaient des séroprévalences non nulles (allant de moins de 25% à plus de 50%), et sur la base du dépistage sérologique de l'année 2012, des béliers séropositifs et séronégatifs ont été sélectionnés (ou choisis) par les éleveurs en proportions équilibrées dans la mesure du possible.

Les races des béliers et leur répartition étaient la suivante : 69 béliers Mérinos, 30 béliers Préalpes du Sud, 91 béliers de races bouchères (Ile-de-France et Texel), 15 béliers issus de croisement entre la race Mérinos et une race bouchère (Ile-de-France, Texel, Charollais ou Suffolk), et 10 béliers classés comme « autres ».

Les béliers ont d'abord été soumis à un examen clinique qui a consisté à déterminer la Note d'Etat Corporel (NEC) et mesurer la circonférence scrotale (CS) au mètre ruban. Pour détecter la présence d'éventuelles lésions, les testicules, épидидymes et cordons spermatiques ont été palpés. Le cas échéant, une échographie des testicules a été réalisée afin d'observer plus précisément la nature des lésions. Les lésions ont été notées en trois classes : Absence (sans lésions détectables à la palpation ou à l'échographie lorsqu'elle a été réalisée), Légères (suspicion de lésions, mais ces dernières ne sont pas évidentes ni à la palpation, ni à l'échographie) et Fortes (lésions évidentes à la palpation et à l'échographie).

Ensuite, la semence des béliers a été prélevée par électroéjaculation et le sperme a été collecté dans des tubes en polypropylène stériles, et maintenu à 37°C dans un contenant thermos. Immédiatement après la collecte, une goutte de sperme a été prélevée pour examen au microscope. Les paramètres suivants ont été mesurés : volume d'éjaculat (en mL), concentration en spermatozoïdes (en spz/mL) mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (AccuRead, IMV-technologies), motilité individuelle (notée de 0 à 5), motilité massale (en %). Pour l'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes, une goutte de sperme a été étalée sur une lame et colorée à l'aide d'une solution d'éosine-nigrosine. Ce frottis a ensuite été séché puis examiné à l'aide d'un microscope avec objectif à immersion, à un grossissement x1000. Sur 200 spermatozoïdes observés, la proportion de spermatozoïdes normaux a été relevée et enregistrée sous forme de pourcentage.

Les béliers ont également fait l'objet d'une prise de sang pour un examen sérologique (recherche d'anticorps anti-*Brucella ovis* par les méthodes de Fixation du Complément, selon la norme AFNOR U47-008, et ELISA indirect (kit IDEXX) (Praud *et al.*, 2012).

Enfin, le sperme a été congelé pour être ensuite analysé par bactériologie et par PCR afin de mesurer les niveaux d'excrétion de la bactérie dans la semence. Les analyses bactériologiques et sérologiques ont été effectuées par le Laboratoire National de Référence des Brucelloses animales de l'ANSES, à Maisons-Alfort.

II.2. Analyse des données

Seuls les béliers pour lesquels tous les paramètres étaient mesurables ont été inclus à l'analyse de données. 215 béliers au total ont donc été retenus pour l'analyse.

Interprétation des résultats de l'examen clinique

Concernant l'examen clinique, les béliers ont été répartis en 3 classes selon leur NEC. Les classes retenues ont été les suivantes :

Tableau 1 : Classes d'interprétation des NEC obtenues

NEC	Classe
< 2	Maigre
[2 ; 3 [En état
≥ 3	Gras

Concernant les Circonférences Scrotales (CS), les classes ont été constituées comme suit :

Tableau 2 : Classes de circonférences scrotales

CS (en cm)	Classe
≤ 26	Insuffisant
[26 ; 32[Moyen
[32 ; 39[Bon
≥ 39	Très bon

Interprétation des résultats des examens sérologiques, bactériologiques et du spermogramme

Pour l'interprétation des résultats des analyses sérologiques en Fixation du Complément (FC), le seuil de positivité retenu a été de 50 UI/mL (seuil OIE et UE¹). Pour l'interprétation des analyses ELISA, les seuils retenus ont été les suivants :

Tableau 3 : Seuils retenus pour l'interprétation des résultats ELISA

Pourcentage de DO ²	Classe
[0 ; 30[Négatif
[30 ; 60[Douteux
≥ 60	Positif

Pour l'interprétation des résultats bactériologiques (évaluation de l'importance de l'excrétion), les seuils retenus ont été les suivants :

Tableau 4 : Seuils d'interprétation des analyses bactériologiques

Nombre d'UFC (Unité Formant Colonie)	Classe
0	Négatif
[1 ; 100[Très faible
[100 ; 1000[Faible
≥ 1000	Fort
Culture confluyente	Très fort

Sur la base des résultats des spermogrammes, un score séminologique a été attribué à chaque bélier, et dépend :

- de la concentration en spermatozoïdes
- du pourcentage de spermatozoïdes anormaux
- de la motilité individuelle des spermatozoïdes.

Les seuils retenus sont présentés dans le tableau suivant, sachant que la note la plus mauvaise obtenue parmi les trois critères retenus déterminait la catégorie finale du bélier :

Tableau 5 : Classification des béliers selon les scores séminologiques

	Bons	Non satisfaisants	Mauvais
Concentration (en milliard de spz par mL)	≥ 1	[0,5; 1[< 0,5
Pourcentage d'anomalies	< 30%	[30% - 50% [≥ 50 %
Motilité	> 70%	[40% – 70%]	< 40%

¹ OIE : Organisation Mondiale de la Santé Animale (ex-Office International des Epizooties) ; UE : Union Européenne

² DO : densité optique

Des analyses descriptives ont été réalisées et pour déterminer les corrélations entre les différents facteurs étudiés, les analyses statistiques ont fait appel au test exact de Fisher. Le logiciel R (<http://www.R-project.org>) a été utilisé pour l'analyse statistique des données. Le seuil de 5% ($p < 0,05$) a été retenu comme significatif.

Les résultats des analyses PCR n'ont pas été valorisés dans cette synthèse, leur interprétation étant relativement délicate, une analyse approfondie restant nécessaire avant valorisation.

III. Résultats et discussion

La première partie des résultats est consacrée à l'analyse descriptive de l'échantillon. La deuxième partie de l'analyse des résultats s'attache à mettre en évidence des relations entre les différents paramètres étudiés.

III.1. Résultats de l'examen clinique

Les caractéristiques cliniques des 215 béliers sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 : Caractéristiques cliniques et âge des béliers analysés

	Moyenne	Ecart-type	Médiane	Mini	Maxi
Age	3,3	1,7	3	1	9
NEC	2,4	0,7	2,25	1,25	4
CS	36,4	3,6	34	26	46

Aucune influence de la NEC sur la note de qualité du sperme n'a pu être mise en évidence dans cette expérimentation, bien qu'une corrélation ait déjà été démontrée dans d'autres travaux similaires. En effet, David C. Van Metre *et al.* (2012), ont mis en évidence une association entre une NEC faible et une qualité de la semence insuffisante. En revanche, dans leur étude, l'obésité n'affectait pas négativement la fertilité des béliers, même si cette hypothèse avait déjà été formulée (Wise, 1983).

De même, dans nos travaux, la CS n'apparaît pas corrélée à la note de qualité du sperme.

III.2. Résultats des analyses sérologiques

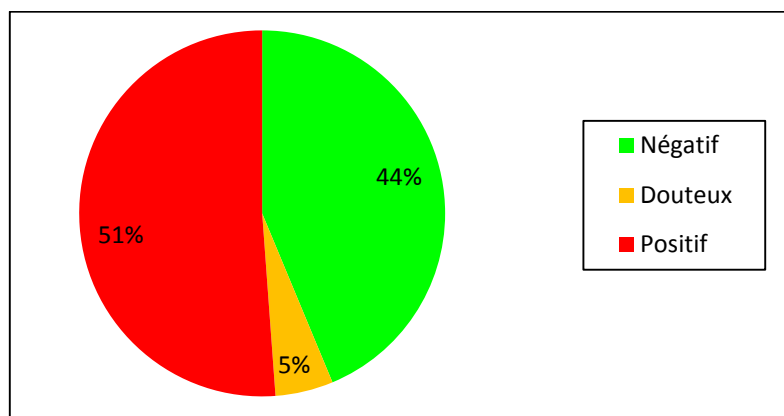


Figure 1 : Répartition des béliers selon leur statut sérologique ELISA (n = 215)

L'analyse des sérums par la méthode ELISA a donné les résultats suivants (figure 1) : 44% des béliers se sont avérés séronégatifs, 5% douteux et 51% séropositifs.

Tableau 7 : Comparaison des résultats obtenus aux deux analyses sérologiques (ELISA/FC)

FC/ELISA	Négatif	Douteux	Positif	Total général
Négatif	94	9	31	134
Positif		1	79	80
Anti-Complémentaire		1		1
Total général	94	11	110	215

Globalement, on observe une bonne concordance entre les résultats du test ELISA et du test de FC. Sur les 11 résultats douteux en ELISA, seul 1 s'est avéré positif en FC. Aucune sérologie positive en ELISA n'est négative en FC (une est douteuse), en revanche, 31 analyses ELISA positives sont négatives en FC.

Pour approfondir l'interprétation des résultats et comparer les deux types d'analyses sérologiques qui ont été effectuées sur les béliers (ELISA et FC), on a créé des classes supplémentaires pour interpréter les résultats. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (le seuil officiel de positivité de la FC de 50 UI/mL).

Tableau 8 : Comparaison des résultats des analyses sérologiques (ELISA et FC)

FC / ELISA	NEG <30	DTX 30-60	Pos + 60-100	Pos ++ 100-200	Pos +++ >200
NEG < 25 UI	98	6	4	4	2
DTX [25 ; 50[UI	0	2	7	11	2
Pos + [50 ; 100[UI	0	1	3	15	1
Pos ++ [100 ; 200 [UI	0	0	2	16	7
Pos +++ ≥ 200 UI	0	0	0	13	23

D'après ces résultats et en utilisant ces classes de niveau d'anticorps, on voit qu'il n'y a que 10 béliers qui sont positifs en ELISA et négatifs en FC. En revanche, si on fixe le seuil de positivité à 50 UI/mL, ce nombre passe à 30. De plus, aucun bélier présentant des anticorps spécifiques en FC mais avec des résultats inférieurs au seuil de 50 UI/mL n'est négatif en ELISA, ce qui signifie probablement qu'en élevage infecté, le seuil de 50 UI/mL est sans doute trop élevé.

La sérologie ELISA est habituellement utilisée en routine dans les élevages (sauf dans le département du 06). Cette dernière a donc été retenue pour l'analyse des résultats, dans un but de valorisation auprès des éleveurs, car ce sont les résultats de cette analyse dont ils disposent.

III.3. Résultats des analyses bactériologiques

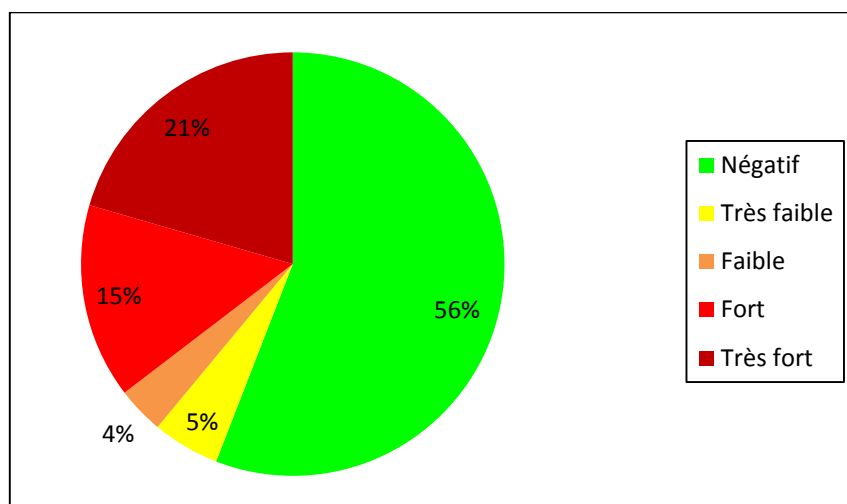


Figure 2 : Répartition des béliers selon leurs résultats bactériologiques (n=195)

Parmi les 215 analyses bactériologiques, 20 résultats ont été ininterprétables en raison de contamination des échantillons par des champignons. Les résultats ont donc été analysés sur 195 échantillons.

D'après les résultats bactériologiques, 56% des béliers n'excrétaient pas de *B. ovis* à un niveau détectable en bactériologie et 44% excrétaient dont 36% fortement. L'excrétion de *B. ovis* dans le sperme étant intermittente, même une faible excrétion doit être considérée comme potentiellement dangereuse. De même que des béliers peuvent avoir donné des résultats négatifs en culture le jour du prélèvement mais se révéler excréteurs lors d'un autre prélèvement.

III.4. Note de qualité du sperme

La répartition des notes de qualité du sperme obtenue par les 215 béliers analysés est présentée dans la figure 3 :

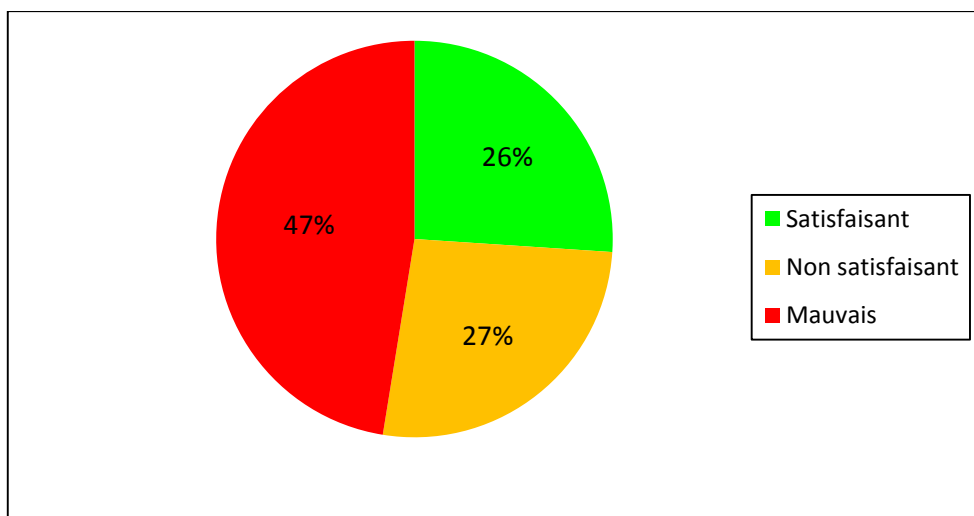


Figure 3 : Répartition des béliers selon la qualité du sperme (n = 215)

On observe que 74% des béliers prélevés présentaient une qualité du sperme insuffisante, selon les critères de qualité définis précédemment et 47% étaient même considérés comme mauvais. Seuls 26% des béliers avaient une bonne valeur fécondante, avec une semence considérée comme satisfaisante pour la reproduction.

III.5. Relations entre sérologie, qualité du sperme et excrétion

Sérologie et qualité du sperme

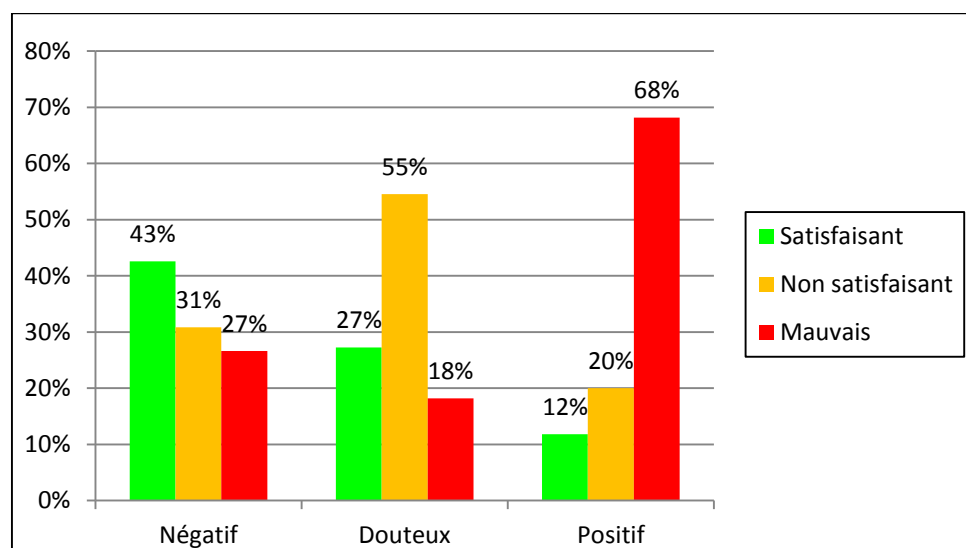


Figure 4 : Qualité du sperme en fonction du résultat sérologique (n = 215)

- 88% des béliers séropositifs en ELISA présentaient un sperme de qualité non satisfaisante voire mauvaise (68%)
- En revanche, 58 % des béliers séronégatifs avaient également un sperme non satisfaisant dont 27% mauvais. Il est important de préciser que plusieurs facteurs peuvent intervenir dans la qualité du sperme et que la séropositivité à *B. ovis* ne peut pas être le seul facteur explicatif de la qualité du sperme. Néanmoins, les béliers séropositifs ont 2,5 fois plus de risques que les séronégatifs d'avoir un sperme mauvais donc d'être peu fertiles voire stériles.
- Un test exact de Fischer appliqué sur l'ensemble des données met en évidence une corrélation entre le statut sérologique vis à vis de *B. ovis* et la qualité du sperme ($p = 9,73.10^{-10}$).

Sérologie et excrétion de la bactérie

Dans le cadre de la mise en place d'un plan de lutte et de réforme sélective des béliers, il est important de pouvoir identifier les béliers excréteurs qui sont susceptibles de contaminer les autres béliers. L'excrétion de la bactérie dans le sperme a été évaluée par analyses bactériologiques. Les résultats de la bactériologie en fonction du statut sérologique (méthode ELISA) sont présentés à la figure 5 :

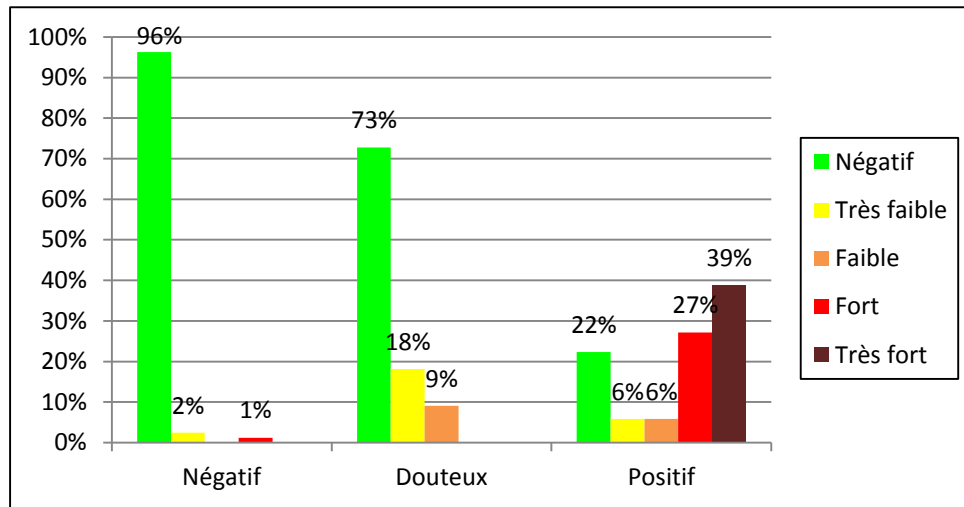


Figure 5 : Relation entre statut sérologique (ELISA) et résultats des analyses bactériologiques (n=195)

On constate que :

- Il y a eu très peu d'analyses bactériologiques positives chez des béliers séronégatifs ou douteux, mais ce risque ne doit pas être négligé. Il pourrait alors s'agir d'infection localisée qui débiterait dans l'appareil génital (contamination suite à saillie après un bélier infecté), sans passer dans la voie systémique, ce qui expliquerait l'absence d'anticorps. Une deuxième possibilité pourrait également être liée à une séronégativisation après une infection ancienne. Cette hypothèse pourrait concerner un des trois béliers concernés qui était relativement âgé (5 ans).
- Par contre, la plupart des animaux séropositifs en ELISA avaient un sperme infecté et étaient donc excréteurs (80/103, soit 78%). De plus, l'excrétion étant intermittente, il est possible que des animaux ayant présenté une excrétion nulle au moment du prélèvement se révèlent en réalité excréteurs.

Si l'on regroupe ces classes d'excrétions en trois classes : Négatif, Faible (qui comprend les classes Très faible et Faible) et Fort (qui comprend les classe Fort et Très fort), un test exact de Fisher met en évidence une corrélation forte entre les résultats sérologiques et l'excrétion de la bactérie dans la semence ($p < 2.10^{-16}$).

En regardant les résultats des béliers séropositifs et séronégatifs séparément, on obtient les graphiques présentés aux figures 6 et 7 :

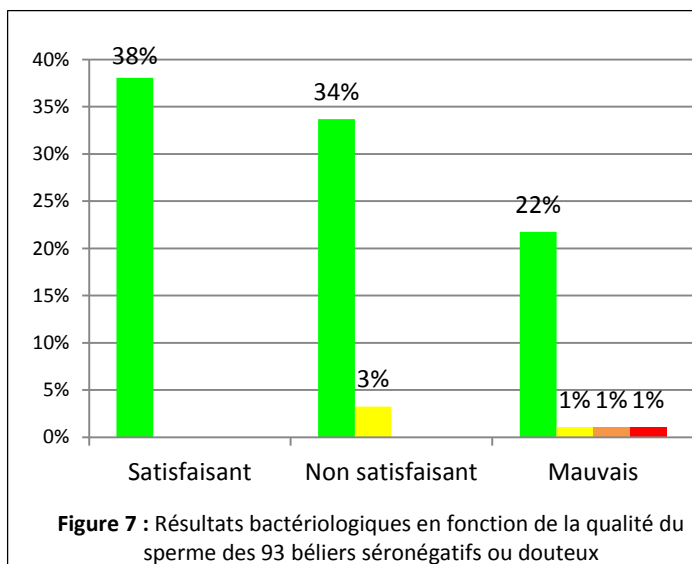


Figure 7 : Résultats bactériologiques en fonction de la qualité du sperme des 93 béliers séronégatifs ou douteux

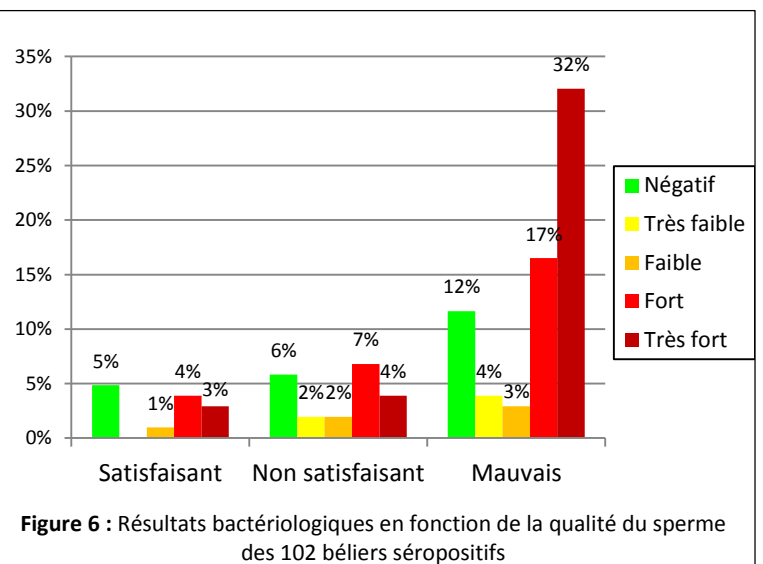


Figure 6 : Résultats bactériologiques en fonction de la qualité du sperme des 102 béliers séropositifs

Ces graphiques montrent bien, en conclusion, que les béliers séronégatifs étaient en majorité bons ou corrects par rapport à leur valeur fécondante et peu ou pas contaminants.

En revanche les séropositifs étaient majoritairement mauvais par rapport à leur qualité fécondante et très souvent contaminants.

Finalement, si on prend en considération ces résultats vis-à-vis de la qualité fécondante et de leur pouvoir contaminant, on peut dire que :

- 38% des spermés des séronégatifs étaient fertiles et non contaminants
- 5% des spermés des séropositifs étaient fertiles et non contaminants. Par contre 49% des spermés des séropositifs étaient mauvais et fortement contaminants.

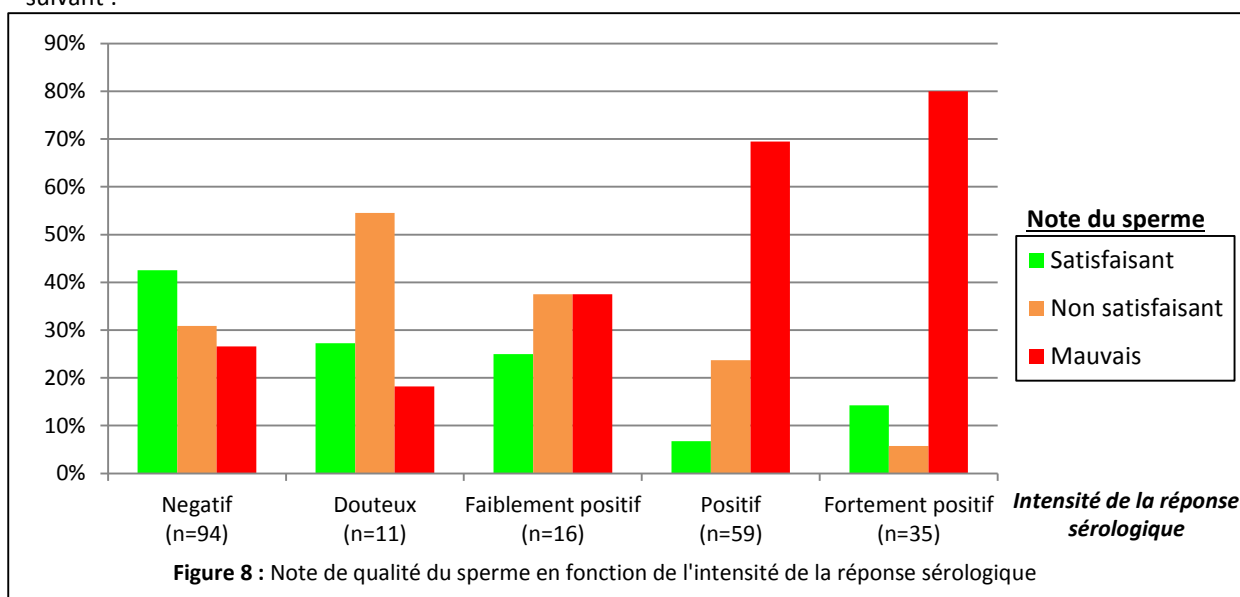
Influence de l'intensité de la réponse sérologique

Les résultats obtenus à l'aide des tests ELISA ont été regroupés en classes selon le pourcentage de Densité Optique (DO) obtenu. Les classes ainsi constituées sont les suivantes (figure 9) :

Tableau 9 : Classes d'intensité de la réponse sérologique ELISA en fonction du %DO

Pourcentage de DO	Classe
[0 ; 30[Négatif
[30 ; 60[Douteux
[60 ; 100[Faiblement positif
[100 ; 200[Positif
≥ 300	Fortement positif

Si l'on met en relation ces classes d'intensité avec la note de qualité du sperme, on obtient le graphique suivant :



De même, si l'on met en relation ces classes avec les niveaux d'excrétion de la bactérie dans le sperme, mesurés par la bactériologie, on obtient le graphique suivant :

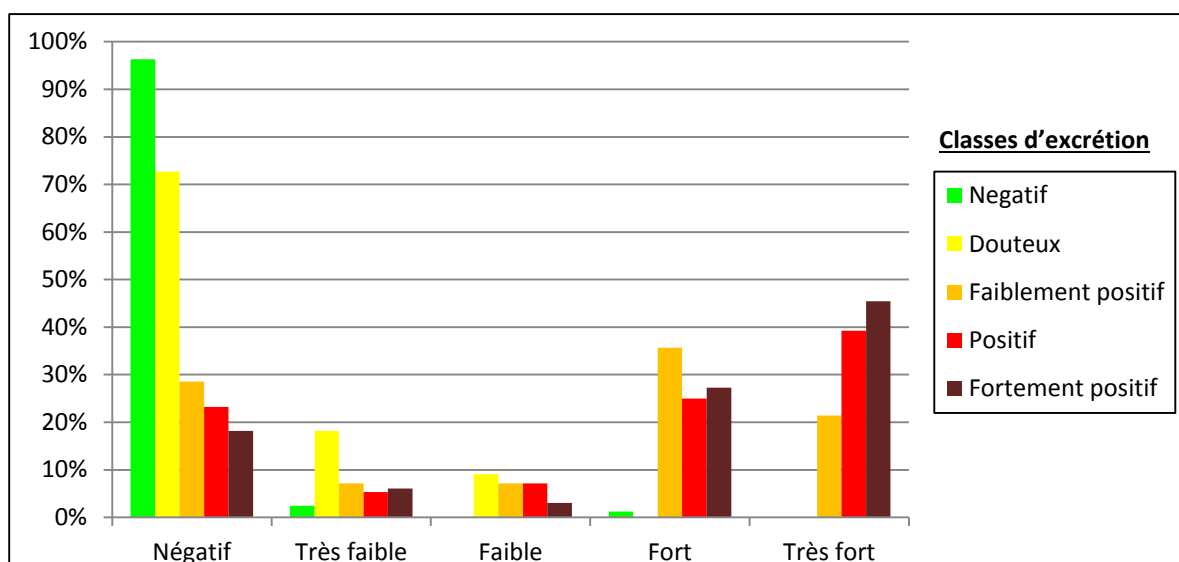


Figure 9 : Classe d'excrétion de la bactérie en fonction de l'intensité de la réponse sérologique

Intensité de la réponse sérologique

Le nombre de classes élevé ne permet pas de confirmer statistiquement le lien entre l'intensité de la réponse sérologique et la qualité du sperme, ni le niveau d'excrétion mais les graphiques permettent cependant de dégager des tendances. Il semblerait que :

- Plus le pourcentage de DO est élevé, plus la proportion de béliers ayant une mauvaise qualité du sperme est importante
- Plus le pourcentage de DO est élevé, plus la proportion de béliers excréteurs est élevée.

Conclusion partielle concernant la sérologie

- La contamination des béliers par *B. ovis* provoque une détérioration de la qualité de la semence. 88% des béliers séropositifs présentent un sperme de qualité insuffisante, bien que d'autres facteurs puissent influencer la qualité du sperme.
- La séropositivité à *B. ovis* et l'excrétion de la bactérie dans le sperme sont corrélées : un bélier séropositif a de grands risques d'être excréteur et donc contaminant.
- Il semble que plus l'intensité de la réaction est importante (% de DO élevé), plus le risque que le bélier soit excréteur, avec une mauvaise qualité de la semence est élevé.

III.6. Relation entre présence de lésions, sérologie, qualité du sperme et excrétion

La palpation est également un outil facilement mobilisable par les éleveurs au quotidien. Cette partie de l'analyse s'attache à mettre en évidence la pertinence de cet outil dans la mise en place d'un plan de lutte et de réforme sélective des béliers.

Lésions et statut sérologique

Les résultats des statuts sérologiques des béliers en fonction de la présence de lésions sont présentés dans le graphique ci-dessous :

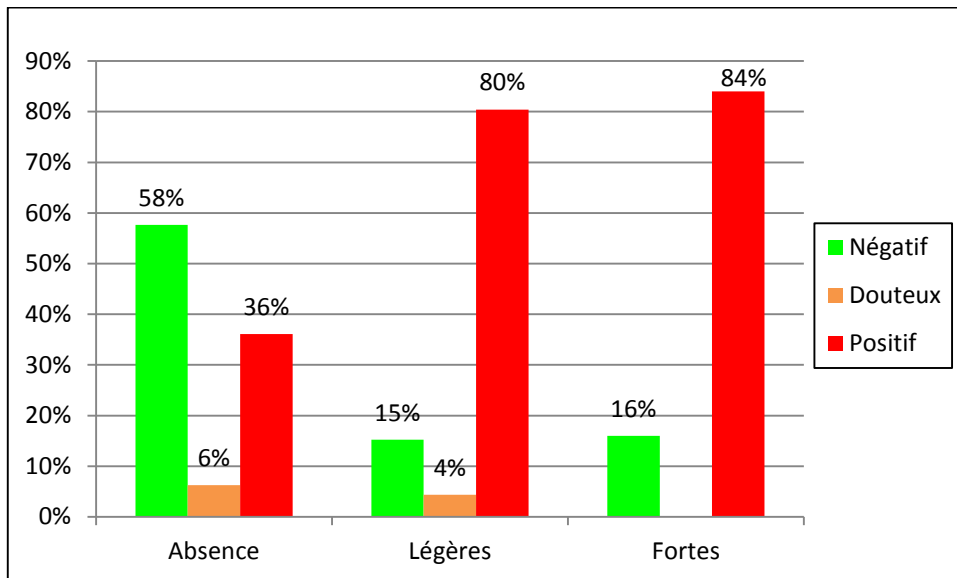


Figure 10 : Résultats sérologiques en fonction du statut clinique (lésions) (n=215)

- Un bélier présentant des lésions, mêmes légères avait de grands risques d'être séropositif (4 fois sur 5).
- En revanche, l'absence de lésions ne permet pas d'affirmer que le bélier est séronégatif : 36% des béliers sans lésion étaient séropositifs. L'infection par *B. ovis* n'est pas toujours synonyme de lésions de l'appareil génital, surtout à un stade précoce de l'infection.
- Un test exact de Fisher appliqué aux données met en évidence une corrélation entre la présence de lésions et la séropositivité vis-à-vis de *B. ovis* ($p = 3,67.10^{-8}$).

Lésions et excrétion de la bactérie

Les résultats des classes d'excrétions bactériologiques des béliers en fonction de leur statut clinique (absence/présence de lésions) sont présentés dans le graphique ci-dessous :

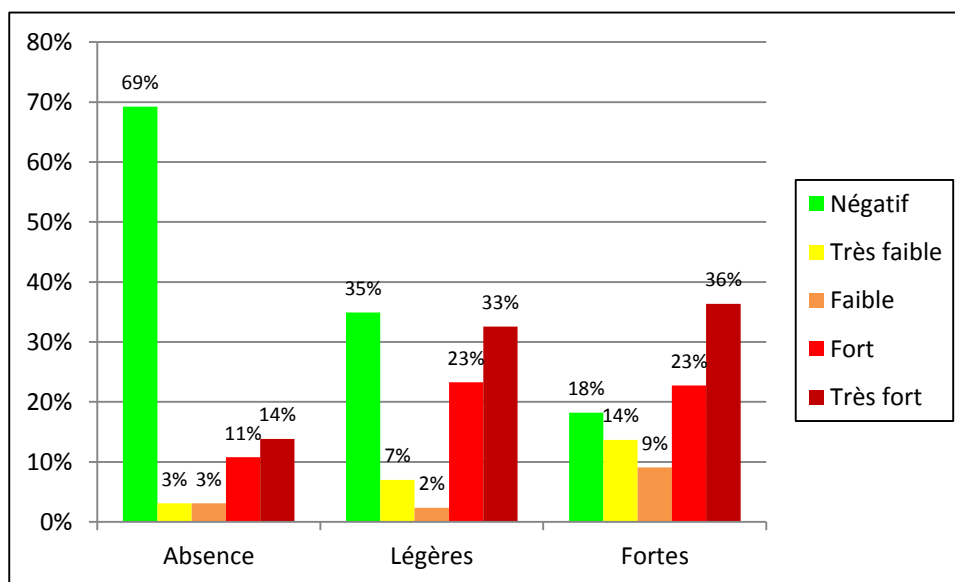


Figure 11 : Résultats bactériologiques en fonction du statut clinique (lésions) (n=195)

- 65% des béliers avec lésions faibles étaient excréteurs (dont 56% fortement) et 82% des béliers avec des lésions fortes étaient excréteurs (dont 59% fortement).
- Par contre, des béliers sans lésion peuvent également être excréteurs (31%, dont 25% fortement).
- Si l'on regroupe les classes d'excrétion en 3 classes : Négatif, Faible (qui comprend les classes Très faible et Faible) et Fort (qui comprend les classes Fort et Très Fort), un test exact de Fisher met en évidence une corrélation entre la présence de lésions et l'excrétion de la bactérie dans le sperme ($p = 8,61.10^{-7}$).

Lésions et qualité du sperme :

Les résultats de la note de qualité du sperme des béliers en fonction de leur statut clinique (absence/présence de lésions) sont présentés dans le graphique ci-dessous :

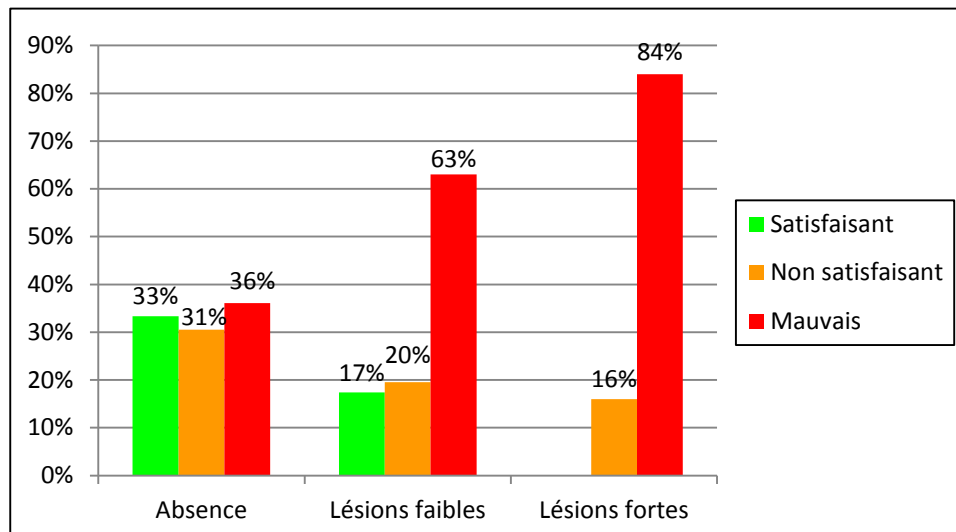


Figure 12 : Note de qualité du sperme en fonction du statut clinique (n=215)

On constate que :

- Tous les béliers avec des lésions fortes avaient une semence de qualité non satisfaisante, et un grand nombre avaient même une semence mauvaise (86%).
- 83% des béliers avec des lésions faibles avaient une semence de mauvaise qualité.
- 67% des béliers sans lésion avaient également une mauvaise qualité de sperme : il est important de rappeler que *B. ovis* n'est pas le seul facteur qui explique une mauvaise qualité de la semence. D'autres facteurs tels que la NEC, la CS, l'âge peuvent intervenir, même si cela n'a pas été mis en évidence dans notre étude.
- Un test exact de Fisher appliqué aux données, met en évidence une corrélation entre les deux facteurs ($p = 6,57.10^{-6}$).

Conclusion partielle sur les lésions

- Plus de 4 béliers sur 5 avec des lésions étaient séropositifs et près de 4 béliers sur 5 étaient excréteurs.
- Tous les béliers avec lésions marquées avaient une semence de qualité insuffisante voire même mauvaise.
- La palpation est donc un outil efficace pour détecter les béliers à risque vis-à-vis de *B. ovis*, mais elle ne suffit pas, puisque des béliers peuvent être cliniquement sains mais séropositifs, excréteurs et/ou avec une mauvaise qualité de la semence.

IV. Valorisation des résultats et plan de lutte

IV.1. Limites de l'étude

L'étude menée présente plusieurs biais qu'il est nécessaire de prendre en compte dans l'analyse des résultats et leur interprétation.

Le premier biais est lié à l'absence de lot témoin (béliers séronégatifs issus de troupeaux entièrement séronégatifs). Pour des raisons logistiques mais aussi sanitaires (mélange d'animaux), prélever un tel lot d'animaux n'a pas été possible. Cependant, cela aurait permis de comparer les résultats entre eux et notamment d'évaluer l'impact réel de la présence de *B. ovis* sur la fertilité des béliers. Pour ce dernier point, en particulier, il est difficile de quantifier avec précision l'effet de l'infection des béliers par *B. ovis*, plusieurs facteurs pouvant impacter la qualité de la semence comme cela a été précisé dans la présentation des résultats.

De plus, un tel lot aurait également permis d'améliorer la compréhension et l'interprétation des résultats PCR qui sont obtenus.

Le deuxième biais concerne la constitution de l'échantillon. Le recrutement des éleveurs s'est fait sur la base du volontariat, et les béliers prélevés ont été choisis par les éleveurs. L'étude ayant eu lieu à l'automne (début de la saison de reproduction), un des critères inévitable était lié à la disponibilité des éleveurs et la présence des béliers sur le siège de l'exploitation (la plupart des béliers étant envoyés en alpage pour la lutte à cette période).

Ensuite, la méthode de récolte de la semence (l'électro-éjaculation) entraîne parfois une dilution de la semence qui peut influencer le calcul de la concentration en spermatozoïdes qui a été utilisé pour l'attribution des notes de qualité de la semence.

Enfin, la méthode de coloration de la semence à l'aide du kit éosine-nigrosine entraîne des anomalies accidentelles du flagelle des spermatozoïdes. L'anomalie « flagelle replié » n'a donc pas été retenue dans l'appréciation du pourcentage d'anomalies.

Ces biais ne remettent pas en question les résultats obtenus et leur interprétation mais il est nécessaire de les interpréter avec prudence et d'en limiter la généralisation.

IV.2. Sérologie et palpation : deux outils pertinents

La réalisation d'un prélèvement de semence suivi d'un spermogramme est difficilement envisageable en routine sur l'ensemble des troupeaux et des béliers de la Région.

En revanche, deux outils sont actuellement disponibles et facilement mobilisables par les éleveurs de la Région PACA : la sérologie et la palpation de l'appareil génital. L'analyse de nos résultats montre que ces outils, utilisés simultanément, sont pertinents dans le cadre d'un plan de lutte.

Nous avons confirmé les résultats de Carvalho Júnior *et al.*, 2012, qui ont montré que séropositivité et mauvaise qualité de la semence sont significativement liées, l'infection par *B. ovis* entraînant une détérioration de la qualité de la semence.

La séropositivité est également significativement liée à l'excrétion de la bactérie dans la semence (observation également formulée par Kott *et al.*, 1988 et Ficapal *et al.*, 1998), ces béliers étant donc contaminants pour le reste du troupeau.

La palpation est aussi un bon indicateur : la présence de lésions est liée significativement à une sérologie positive, à une excrétion de la bactérie dans la semence et à une mauvaise qualité du sperme.

Mais utiliser ces deux outils indépendamment n'est pas suffisant pour maîtriser l'infection. En effet, bien que séropositivité et présence de lésions soient significativement corrélées, cette observation n'est pas systématique. En effet, des béliers peuvent être cliniquement sains (sans lésion) mais séropositifs et surtout excréteurs et donc participer à la propagation de l'infection dans le troupeau. Il est donc nécessaire de coupler ces deux outils et de réformer systématiquement tout animal qui présente des lésions de l'appareil génital, et/ou qui est séropositif.

IV.3. Recommandations pour une réforme orientée

Le contexte épidémiologique doit impérativement être pris en compte dans la formulation d'un plan de lutte, d'autant que ce dernier est très variable selon les départements de la Région PACA.

Dans des départements où les cheptels ont des prévalences faibles (comme c'est le cas dans les Hautes-Alpes et les Alpes-de-Haute-Provence), la réforme systématique des animaux séropositifs et/ou à lésions après un dépistage sérologique annuel (voire avant chaque lutte) est envisageable, de manière à tenter une éradication rapide de l'infection dans les troupeaux touchés.

Par contre dans les départements où les cheptels atteignent des taux de prévalence très élevés (Bouches-du-Rhône notamment), la réforme systématique des animaux séropositifs est délicate (les effectifs à réformer peuvent rapidement être importants et représenter une part élevée du troupeau de béliers). Dans ces départements, on peut alors envisager dans un premier temps une réforme sélective des animaux séropositifs qui présentent également des lésions. Un dépistage (sérologique et palpation) avant chaque lutte permettrait ensuite de pouvoir séparer le troupeau de béliers en deux lots (un lot de séronégatifs et un lot de séropositifs que l'on conserve par nécessité, pour avoir un nombre suffisant de béliers) avant la lutte. Plus le dépistage de la maladie sera précoce, et plus et plus le risque de contamination sera faible, notamment entre jeunes béliers. On peut également envisager de faire passer d'abord les béliers séronégatifs puis les séropositifs (en ayant retiré les séropositifs pour éviter les contaminations). Le but de cette séparation est de limiter au maximum la transmission de la maladie, la lutte étant la période la plus critique dans la transmission de la maladie. Les béliers séropositifs présentant des problèmes de fertilité, il faudra veiller à majorer le nombre de béliers par brebis dans le troupeau de séropositifs.

Néanmoins cette stratégie risque de conduire à l'élimination d'un nombre important de béliers. De plus, comme les résultats l'ont montré, certains animaux peuvent être séronégatifs et sans lésion apparente mais excréter la bactérie dans la semence et donc contribuer à propager l'infection, d'où l'importance d'un contrôle sérologique régulier des mâles reproducteurs. Ce qui sera d'autant plus difficilement acceptable dans des élevages qui auraient choisi l'élimination (avec un impact économique qui peut être non négligeable, surtout si le troupeau comporte des béliers sélectionnés).

Dans ce cas précis, la vaccination des jeunes béliers, âgés de 3 à 6 mois et destinés à la monte naturelle, à l'aide du vaccin Rev.1 conjonctival pourrait être envisagée. Un tel plan est déjà mis en œuvre dans les Pyrénées-Atlantiques, où le taux de prévalence atteignait 24% des troupeaux en 2011.

Les jeunes mâles seraient ainsi protégés, sans que le dépistage sérologique de la brucellose classique ni de l'épididymite contagieuse ne soit perturbé (disparition des anticorps post-vaccinaux en moins de 4 mois, et peu ou pas de réaction sérologique croisée entre *B. ovis* et *B. melitensis*). Le but de cette vaccination étant de réduire rapidement la prévalence de la maladie et dès que possible de remplacer la vaccination par une prophylaxie exclusivement sanitaire, telle qu'elle est pratiquée aujourd'hui.

Mais la vaccination pose deux problèmes majeurs :

- Règlementairement, la dérogation qui permet la vaccination n'est accordée que jusqu'à l'âge de 6 mois. Se pose alors le problème des béliers de race bouchère achetés adultes dans le Centre de la France qui ne pourront donc pas être vaccinés, problème d'autant plus important que la valeur de ces animaux est souvent élevée.
- De plus, la vaccination implique un changement de statut du troupeau vis-à-vis de la brucellose, ce qui entraînerait des difficultés notamment lors des achats et lors de la transhumance, pratique courante et partie intégrante du système d'élevage d'un grand nombre de cheptels de la Région.

La mise en place d'un plan de lutte ou la simple formulation de recommandations reste difficile à mettre en œuvre sur le terrain, d'autant plus que les conséquences de l'infection des béliers par *B. ovis* classiquement évoquées (problèmes de fertilité et baisse de la productivité) sont rarement ressenties par les éleveurs. Ceci est très probablement dû aux systèmes d'élevages de la Région : les troupeaux sont généralement de taille importante et la lutte se fait par lot (deux luttes, une de printemps et une d'automne sont couramment pratiquées). Le nombre de béliers par brebis mise en lutte est donc souvent relativement élevé. Ainsi, même si certains béliers sont peu fertiles, les conséquences sont minorées par un effectif de béliers important.

V. Conclusion

D'après les résultats de l'étude, confirmés par la bibliographie, les béliers séropositifs présentent significativement plus de lésions de l'appareil génital, ont une semence de qualité moindre et la probabilité qu'ils soient excréteurs est plus élevée : il est donc raisonnable d'éliminer les béliers séropositifs, qu'ils présentent des lésions ou non.

Dans le contexte d'un élevage à prévalence très élevée, la réforme prioritaire des béliers séropositifs avec des lésions peut être un premier pas pour progresser dans l'assainissement du cheptel. Effectuer un dépistage sérologique ainsi qu'une palpation avant chaque lutte permet également de repérer précocement les béliers potentiellement dangereux, la lutte étant la période privilégiée pour la transmission de l'infection.

Dans tous les cas, effectuer systématiquement une palpation et une sérologie à chaque achat est indispensable afin d'éviter l'introduction ou la propagation de la maladie dans son cheptel. Enfin, le mélange de troupeaux en transhumance peut également être une pratique à risque qu'il convient de prendre en compte : le regroupement par troupeaux de mêmes statuts vis-à-vis de *B. ovis* permettrait de limiter ce risque.

Bibliographie

CARVALHO JUNIOR CA, MOUSTACAS VS, XAVIER MN, COSTA EA, COSTA LF, SILVA TMA, PAIXÃO TA, BORGES AM, GOUVEIA AMG, SANTOS RL - Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Research*, 2012, **102**, 213–222.

FICAPAL A, JORDANA J, BLASCO JM, MORIYON I - Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Ruminant Research*, 1998, **29**, 13–19.

KOTT RW, HALVER GC, FIREHAMMER B, THOMAS VM - Relationships between *Brucella ovis* semen culture and various semen and serology parameters. *Theriogenology*, 1988, **29**, 961-970.

PRAUD A, CHAMPION JL, CORDE Y, DRAPEAU A, MEYER L, GARIN-BASTUJI B - Assessment of the diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Veterinary Research*, 2012, **8**, 68-74 - <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/68>

VAN METRE DC, SANGEETA RAO S, KIMBERLING CV, MORLEY PS - Factors associated with failure in breeding soundness examination of Western USA rams. *Preventive Vet Med*, 2012, **105**, 118–126.

WISE, C.M., 1983. Ram management for maximum reproductive performance in the range flock. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.* 5, S649–S653. World Organization for Animal Health, 2011. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*.