

## Sommaire

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Liste des enseignants</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>Remerciements</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>Sommaire</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>Liste des abréviations</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>Table des illustrations</b> .....   | <b>11</b> |
| 1. Liste des graphes .....   | 11        |
| 2. Liste des photographies .....   | 12        |
| 3. Liste des schémas .....   | 12        |
| 4. Liste des tableaux .....  | 12        |
| <b>I. Introduction</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>II. Rappels sur l'épididymite contagieuse du bélier</b> .....                   | <b>16</b> |
| 1. Clinique et conséquences technico-économiques .....                             | 16        |
| 2. Transmission et dynamique de l'infection .....                                  | 16        |
| 3. Diagnostic .....  | 17        |
| 3.1. Diagnostic clinique.....  | 17        |
| 3.2. Diagnostic de laboratoire.....  | 17        |
| 3.2.1. Manipulation de <i>B. ovis</i> : danger et risque .....                     | 17        |
| 3.2.2. Méthodes sérologiques.....  | 18        |
| 3.2.3. Méthodes bactériologiques : mise en culture du sperme .....                 | 18        |
| 3.2.4. Méthodes moléculaires : Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).....     | 18        |
| <b>III. Situation épidémiologique vis-à-vis de l'épididymite contagieuse</b> ..... | <b>19</b> |
| 1. Situation épidémiologique globale .....   | 19        |
| 2. Situation épidémiologique en région PACA : point de départ de l'étude .....     | 19        |
| 2.1. Mise en évidence de la recrudescence de la maladie .....                      | 19        |
| 2.2. Résultats des campagnes de dépistage sérologique .....                        | 20        |
| <b>IV. Matériel et Méthode</b> .....   | <b>22</b> |
| 1. Organisation de l'étude : date, lieu, participants .....                        | 22        |
| 2. Examen des béliers .....  | 22        |
| 2.1. Recueil des commémoratifs.....  | 22        |
| 2.2. Examen clinique.....  | 23        |
| 2.2.1. Examen clinique général .....   | 23        |
| 2.2.2. Examen de l'appareil génital .....  | 23        |
| 3. Récole du sperme et examen séminologique .....                                  | 23        |
| 3.1. Récolte du sperme .....   | 23        |
| 3.2. Examen séminologique .....  | 23        |
| 3.2.1. Aspects macroscopiques .....  | 24        |
| 3.2.2. Aspects microscopiques .....  | 24        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4. Prélèvements et analyses de laboratoire .....   | 25        |
| 4.1. Prélèvement de sang .....   | 25        |
| 4.1.1. Réaction de fixation du complément (FC) .....   | 25        |
| 4.1.2. Test ELISA indirect (I-ELISA) .....   | 26        |
| 4.2. Prélèvement de sperme .....   | 26        |
| 5. Classement des béliers .....  | 26        |
| 5.1. Classement des béliers selon la clinique : score clinique .....   | 26        |
| 5.1.1. Paramètres « âge », « NEC » et « CS » .....   | 26        |
| 5.1.2. Paramètre « lésions de l'appareil génital » .....   | 27        |
| 5.1.3. Score clinique .....  | 27        |
| 5.2. Classement des béliers selon la qualité de la semence : score séminologique .....   | 28        |
| 5.2.1. Paramètres « motilité individuelle », « anomalies des spermatozoïdes » et<br>« quantité de spermatozoïdes par éjaculat » .....      | 28        |
| 5.2.2. Score séminologique .....   | 28        |
| 6. Analyse statistique .....   | 29        |
| <b>V. Résultats .....</b>  | <b>30</b> |
| 1. Paramètres cliniques .....  | 30        |
| 1.1. Age et race .....   | 30        |
| 1.1.1. Age .....   | 30        |
| 1.1.2. Race .....  | 30        |
| 1.2. Note d'Etat Corporel (NEC) .....  | 31        |
| 1.3. Circonférence Scrotale (CS) .....   | 32        |
| 1.4. Lésions de l'appareil génital .....   | 32        |
| 1.5. Score clinique .....  | 33        |
| 2. Paramètres séminologiques .....   | 34        |
| 2.1. Motilité individuelle .....   | 34        |
| 2.2. Quantité de spermatozoïdes par éjaculat .....   | 34        |
| 2.3. Anomalies des spermatozoïdes .....  | 35        |
| 2.4. Qualité de la semence (score séminologique) .....   | 36        |
| 3. Données sérologiques préalables à l'étude .....   | 37        |
| 3.1. Données sérologiques pour les années 2010, 2011 et 2012 .....   | 37        |
| 3.2. Fluctuations sérologiques pour la période 2010-2012 .....   | 37        |
| 4. Résultats des analyses sérologiques de septembre 2012 .....   | 38        |
| 4.1. Résultats obtenus en FC .....   | 38        |
| 4.2. Résultats obtenus en I-ELISA .....  | 38        |
| 4.3. Fluctuations sérologiques pendant l'année 2012 .....  | 38        |
| 4.4. Relation entre les résultats en FC et en I-ELISA .....  | 39        |
| 5. Résultats des cultures et des PCR .....   | 40        |
| 5.1. Résultats des cultures .....  | 40        |
| 5.2. Résultats des PCR .....   | 40        |
| 5.3. Relation entre les résultats des cultures et des PCR .....  | 41        |
| 6. Relations entre statut sérologique des béliers (FC et I-ELISA) et excrétion de <i>B. ovis</i> dans<br>le sperme (cultures et PCR) ..... | 42        |
| 6.1. Relation entre FC et cultures .....   | 42        |
| 6.2. Relation entre I-ELISA et cultures .....  | 43        |
| 7. Relations entre statut clinique des béliers (score clinique) et excrétion de <i>B. ovis</i> dans le<br>sperme (cultures et PCR) .....   | 45        |

|  |           |
|--|-----------|
| 8. Relations entre statut séminologique des béliers (score séminologique) et excrétion de <i>B. ovis</i> dans le sperme (cultures et PCR).....                 | 46        |
| <b>VI. Discussion .....</b>  | <b>48</b> |
| 1. Discussion du Matériel et Méthode .....   | 48        |
| 1.1. Biais.....  | 48        |
| 1.1.1. Biais liés au choix des élevages et des béliers.....  | 48        |
| 1.1.2. Biais liés à l'examen d'un nombre élevé de béliers .....  | 48        |
| 1.1.3. Biais liés aux techniques .....   | 49        |
| 1.2. Seuils .....  | 49        |
| 1.2.1. Choix des seuils pour les méthodes sérologiques.....  | 49        |
| 1.2.2. Choix des seuils pour les paramètres cliniques et séminologiques .....  | 49        |
| 1.2.3. Choix des seuils pour l'analyse statistique.....  | 51        |
| 2. Discussion des résultats : interprétation et données de la littérature .....  | 51        |
| 2.1. Résultats des analyses sérologiques .....   | 51        |
| 2.2. Résultats des cultures et des PCR .....   | 51        |
| 2.3. Relations entre statut sérologique et excrétion de <i>B. ovis</i> dans le sperme .....  | 52        |
| 2.4. Relations entre statut clinique et excrétion de <i>B. ovis</i> dans le sperme .....   | 52        |
| 2.5. Relations entre statut séminologique et excrétion de <i>B. ovis</i> dans le sperme.....   | 53        |
| 3. Proposition d'un plan de réforme des béliers.....   | 53        |
| 3.1. Département à faible prévalence.....  | 54        |
| 3.2. Département à forte prévalence .....  | 54        |
| 4. Perspectives.....   | 56        |
| <b>VII. Conclusion.....</b>  | <b>57</b> |
| <b>VIII. Bibliographie .....</b>   | <b>58</b> |
| <b>IX. Annexes.....</b>  | <b>60</b> |
| <b>Annexe N°I : paramètres cliniques et séminologiques moyens en fonction des élevages .60</b>   |           |
| <b>Annexe N°II : motilité massale.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>Annexe N°III : relations entre statut sérologique des béliers (FC et ELISA) et excrétion de <i>B. ovis</i> dans le sperme (PCR).....</b>                    | <b>62</b> |
| 1. Relation entre le statut sérologique en FC et les PCR .....   | 62        |
| 2. Relation entre le statut sérologique en I-ELISA et les PCR .....  | 63        |
| <b>Annexe N°IV : relations entre les quatre paramètres cliniques (âge, NEC, CS et lésions) et l'excrétion de <i>B. ovis</i> dans le sperme (cultures).....</b> | <b>64</b> |
| 1. Relation entre l'âge des béliers et les cultures .....  | 64        |
| 2. Relation entre les NEC des béliers et les cultures .....  | 65        |
| 3. Relation entre les CS des béliers et les cultures .....   | 66        |
| 4. Relation entre les lésions de l'appareil génital et les cultures.....   | 67        |

**Annexe N°V : relations entre statut clinique des béliers (score clinique, âge, NEC, CS et lésions de l'appareil génital) et excrétion de *B. ovis* dans le sperme (PCR).....68**

1. Relation entre le statut clinique des béliers (score clinique) et les PCR .....68
2. Relation entre l'âge des béliers et les PCR .....69
3. Relation entre les NEC des béliers et les PCR .....70
4. Relation entre les CS des béliers et les PCR .....71
5. Relation entre les lésions de l'appareil génital et les PCR.....72

**Annexe N°VI : relations entre les trois paramètres séminologiques (motilité individuelle, quantité de spermatozoïdes par éjaculat, anomalies des spermatozoïdes) et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme (cultures .....73**

1. Relation entre les motilités individuelles des béliers et les cultures .....73
2. Relation entre les quantités de spermatozoïdes par éjaculat et les cultures .....74
3. Relation entre les anomalies des spermatozoïdes et les cultures .....75

**Annexe N°VII : relations entre le statut séminologique des béliers (score séminologique, motilité individuelle, quantité de spermatozoïdes par éjaculat et anomalies des spermatozoïdes) et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme (PCR) .....76**

1. Relation entre le statut séminologique des béliers (score séminologique) et les PCR .....76
2. Relation entre les motilités individuelles des béliers et les PCR .....77
3. Relation entre la quantité de spermatozoïdes par éjaculat et les PCR.....78
4. Relation entre les anomalies des spermatozoïdes et les PCR .....79

## **Liste des abréviations**

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

CS : Circonférence Scrotale

ENVN : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

FC : Fixation du Complément

FRGDS-PACA : Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire de Provence Alpes Côte d'Azur

GDS : Groupements de Défense Sanitaire

IDG : Immunodiffusion sur Gélose

I-ELISA : Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

JBT : Journée Bovine Toulousaine

LNR : Laboratoire National de Référence

NEC : Note d'Etat Corporel

OIE, OMS : Office International des Epizooties, Organisation Mondiale de la Santé animale

PACA : Provence Alpes Côte d'Azur

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

SNGTV : Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires

UE : Union Européenne

## Table des illustrations

### 1. Liste des graphes

|   |    |
|---|----|
| Graphe n°1 : répartition des scores cliniques des 218 béliers .....   | 33 |
| Graphe n°2 : répartition des scores séminologiques des 218 béliers .....  | 36 |
| Graphe n°3 : répartition des résultats de FC des 218 béliers .....  | 38 |
| Graphe n°4 : répartition des résultats d'I-ELISA des 218 béliers .....  | 38 |
| Graphe n°5 : relation entre les résultats en FC et en I-ELISA.....  | 39 |
| Graphe n°6 : résultats des cultures pour les 218 béliers .....  | 40 |
| Graphe n°7 : résultats des PCR des 218 béliers .....  | 40 |
| Graphe n°8 : relation entre les résultats des cultures et des PCR.....  | 41 |
| Graphe n°9 : relation entre statut sérologique des béliers en FC et cultures .....                                  | 42 |
| Graphe n°10 : relation entre statut sérologique des béliers en I-ELISA et cultures .....                            | 43 |
| Graphe n°11 : relation entre statut clinique des béliers (score clinique) et cultures .....                         | 45 |
| Graphe n°12 : relation entre qualité de la semence (score séminologique) et cultures .....                          | 46 |
| Graphe n°13 : relation entre statut sérologique en FC et PCR .....  | 62 |
| Graphe n°14 : relation entre statut sérologique en I-ELISA et PCR.....  | 63 |
| Graphe n°15 : relation entre âge des béliers et cultures .....  | 64 |
| Graphe n°16 : relation entre NEC des béliers et cultures .....  | 65 |
| Graphe n°17 : relation entre CS des béliers et cultures .....   | 66 |
| Graphe n°18 : relation entre lésions et cultures .....  | 67 |
| Graphe n°19 : relation entre statut clinique des béliers (score clinique) et PCR.....                               | 68 |
| Graphe n°20 : relation entre âge des béliers et PCR .....   | 69 |
| Graphe n°21 : relation entre NEC des béliers et PCR .....   | 70 |
| Graphe n°22 : relation entre CS des béliers et PCR.....   | 71 |
| Graphe n°23 : relation entre lésions de l'appareil génital et PCR.....  | 72 |
| Graphe n°24 : relation entre motilités individuelles des béliers et cultures .....                                  | 73 |
| Graphe n°25 : relation entre quantités de spermatozoïdes par éjaculat et cultures .....                             | 74 |
| Graphe n°26 : relation entre anomalies des spermatozoïdes (pourcentage de spermatozoïdes normaux) et cultures ..... | 75 |
| Graphe n°27 : relation entre qualité de la semence (score séminologique) et PCR.....                                | 76 |
| Graphe n°28 : relation entre motilités individuelles des béliers et PCR .....                                       | 77 |
| Graphe n°29 : relation entre quantité de spermatozoïdes par éjaculat et PCR .....                                   | 78 |
| Graphe n°30 : relation entre anomalies des spermatozoïdes (pourcentage de spermatozoïdes normaux) et PCR.....       | 79 |

## 2. Liste des photographies

|   |    |
|---|----|
| Photographies n°1a et n°1b : exemples de lames colorées (source : ENVVT).....   | 25 |
| Photographie n°2 : Mérinos d'Arles (source : ENVVT).....  | 31 |
| Photographies n°3a et n°3b : 3a, dégénérescence ou asymétrie testiculaire ; 3b, inflammation de l'épididyme (source : ENVVT)..... | 33 |

## 3. Liste des schémas

|   |    |
|---|----|
| Schéma n°1 : arbre de décision utilisable dans les zones de faible prévalence ..... | 54 |
| Schéma n°2 : arbre de décision utilisable dans les zones de forte prévalence.....   | 55 |

## 4. Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| Tableau n°1 : sensibilités et spécificités respectives des méthodes I-ELISA et FC (PRAUD <i>et al.</i> , 2012)..... | 18 |
| Tableau n°2 : résultats des sérologies (I-ELISA) des 167 jeunes béliers (décembre 2008).....                        | 19 |
| Tableau n°3 : résultats des sérologies (I-ELISA) des 161 jeunes béliers (avril 2009).....                           | 20 |
| Tableau n°4 : résultats de la campagne de dépistage sérologique de 2010 .....                                       | 20 |
| Tableau n°5 : résultats de la campagne de dépistage sérologique de 2011 .....                                       | 20 |
| Tableau n°6 : départements et élevages d'origine des 218 béliers.....   | 22 |
| Tableau n°7 : critères de notation pour la motilité massale .....   | 24 |
| Tableau n°8 : liste des principales anomalies des spermatozoïdes .....  | 24 |
| Tableau n°9 : seuils en FC .....  | 25 |
| Tableau n°10 : seuils en I-ELISA .....  | 26 |
| Tableau n°11 : critères utilisés pour les paramètres cliniques « âge », « NEC » et « CS » .....                     | 27 |
| Tableau n°12 : critères utilisés pour le paramètre clinique « lésions de l'appareil génital » ...                   | 27 |
| Tableau n°13 : score clinique.....  | 27 |
| Tableau n°14 : critères utilisés pour les paramètres séminologiques .....   | 28 |
| Tableau n°15 : score séminologique .....  | 28 |
| Tableau n°16 : distribution des âges.....   | 30 |
| Tableau n°17 : répartition des 218 béliers par catégories d'âge .....   | 30 |
| Tableau n°18 : répartition des 218 béliers selon les races .....  | 30 |
| Tableau n°19 : distribution des NEC.....  | 31 |
| Tableau n°20 : répartition des 218 béliers par catégories de NEC.....   | 31 |
| Tableau n°21 : distribution des CS.....   | 32 |
| Tableau n°22 : répartition des 218 béliers par catégories de CS .....   | 32 |

|   |    |
|---|----|
| Tableau n°23 : lésions de l'appareil génital.....   | 32 |
| Tableau n°24 : distribution des motilités individuelles .....   | 34 |
| Tableau n°25 : répartition des 218 béliers par catégories de motilité individuelle .....  | 34 |
| Tableau n°26 : distribution des quantités de spermatozoïdes par éjaculat .....  | 34 |
| Tableau n°27 : répartition des 218 béliers par catégories de quantité de spermatozoïdes par éjaculat.....   | 35 |
| Tableau n°28 : distribution des anomalies des spermatozoïdes (pourcentages de spermatozoïdes anormaux et normaux).....                            | 35 |
| Tableau n°29 : distribution des différents types d'anomalies des spermatozoïdes .....   | 35 |
| Tableau n°30 : répartition des 218 béliers par catégories d'anomalies des spermatozoïdes (pourcentages de spermatozoïdes normaux).....            | 36 |
| Tableau n°31 : relation entre les résultats des analyses sérologiques réalisées en 2010 et en 2012 .....  | 37 |
| Tableau n°32 : relation entre les résultats des analyses sérologiques réalisées en 2012 .....   | 38 |
| Tableau n°33 : relation entre les résultats en FC et en I-ELISA, en pourcentage de l'effectif total.....  | 39 |
| Tableau n°34 : statistiques relatives à l'étude de la relation entre FC et I-ELISA .....  | 40 |
| Tableau n°35 : relation entre les résultats des cultures et des PCR, en pourcentage du total par catégories de cultures.....                      | 41 |
| Tableau n°36 : statistiques relatives à l'étude de la relation entre cultures et PCR.....   | 41 |
| Tableau n°37 : relation entre statut sérologique des béliers en FC et cultures, en pourcentage de l'effectif total.....                           | 42 |
| Tableau n°38 : statistiques relatives à l'étude de la relation entre FC et cultures.....  | 43 |
| Tableau n°39 : relation entre statut sérologique des béliers en I-ELISA et cultures, en pourcentage de l'effectif total .....                     | 44 |
| Tableau n°40 : statistiques relatives à l'étude de la relation entre I-ELISA et cultures.....   | 44 |
| Tableau n°41 : relation entre statut clinique des béliers (score clinique) et cultures, en pourcentage par catégories de score clinique.....      | 45 |
| Tableau n°42 : statistiques relatives à l'étude de la relation entre score clinique et cultures ...   | 45 |
| Tableau n°43 : relation entre qualité de la semence (score séminologique) et cultures, en pourcentage par catégories de score séminologique ..... | 46 |
| Tableau n°44 : statistiques relatives à l'étude de la relation entre score séminologique et cultures.....   | 47 |
| Tableau n°45 : seuils utilisés par VAN METRE <i>et al.</i> (2012).....  | 49 |
| Tableau n°46 : seuils utilisés par KIMBERLING and PARSONS (2007).....   | 50 |
| Tableau n°47 : valeurs usuelles relatives au volume et à la concentration des éjaculats de béliers d'après WATSON (1990).....                     | 50 |
| Tableau n°48 : résultats des études de MANTEROLA <i>et al.</i> (2003) et XAVIER <i>et al.</i> (2010) .....  | 51 |
| Tableau n°49 : paramètres cliniques moyens en fonction des élevages .....   | 60 |

|   |    |
|---|----|
| Tableau n°50 : paramètres séminologiques moyens en fonction des élevages.....   | 60 |
| Tableau n°51 : distribution des motilités massales .....  | 61 |
| Tableau n°52 : répartition des 218 béliers selon leur motilité massale .....  | 61 |
| Tableau n°53 : relation entre statut sérologique en FC et PCR, en pourcentage du total par catégories de FC .....   | 62 |
| Tableau n°54 : relation entre statut sérologique en I-ELISA et PCR, en pourcentage du total par catégories d'I-ELISA.....   | 63 |
| Tableau n°55 : relation entre âge des béliers et cultures, en pourcentage de l'effectif total ....  | 64 |
| Tableau n°56 : relation entre NEC des béliers et cultures, en pourcentage de l'effectif total ..  | 65 |
| Tableau n°57 : relation entre CS des béliers et cultures, en pourcentage de l'effectif total.....   | 66 |
| Tableau n°58 : relation entre lésions et cultures, en pourcentage de l'effectif total .....   | 67 |
| Tableau n°59 : relation entre statut clinique des béliers (score clinique) et PCR, en pourcentage du total par catégories de statut clinique .....                                  | 68 |
| Tableau n°60 : relation entre âge des béliers et PCR, en pourcentage du total par catégories d'âges.....  | 69 |
| Tableau n°61 : relation entre NEC des béliers et PCR, en pourcentage du total par catégories de NEC.....  | 70 |
| Tableau n°62 : relation entre CS des béliers et PCR, en pourcentage du total par catégories de CS .....   | 71 |
| Tableau n°63 : relation entre lésions de l'appareil génital et PCR, en pourcentage du total par catégories de lésions .....   | 72 |
| Tableau n°64 : relation entre motilités individuelles des béliers et cultures, en pourcentage de l'effectif total.....  | 73 |
| Tableau n°65 : relation entre quantités de spermatozoïdes par éjaculat et cultures, en pourcentage de l'effectif total .....  | 74 |
| Tableau n°66 : relation entre anomalies des spermatozoïdes (pourcentage de spermatozoïdes normaux) et cultures, en pourcentage de l'effectif total.....                             | 75 |
| Tableau n°67 : relation entre qualité de la semence (score séminologique) et PCR, en pourcentage par catégories de statut séminologique .....                                       | 76 |
| Tableau n°68 : relation entre motilités individuelles des béliers et PCR, en pourcentage du total par catégories de motilité individuelle.....                                      | 77 |
| Tableau n°69 : relation entre quantité de spermatozoïdes par éjaculat et PCR, en pourcentage du total par catégories de quantité de spermatozoïdes par éjaculat.....                | 78 |
| Tableau n°70 : relation entre anomalies des spermatozoïdes (pourcentage de spermatozoïdes normaux) et PCR, en pourcentage du total par catégories d'anomalies des spermatozoïdes... | 79 |

## **I. Introduction**

L'épididymite contagieuse du bélier est due à une bactérie à gram négatif, *Brucella ovis*, et est considérée comme une cause majeure de problème de reproduction en élevage ovin dans les régions où elle sévit.

Début septembre 2012, face à une situation épidémiologique préoccupante en région Provence Alpes Côte d'Azur (PACA) vis-à-vis de cette affection, une étude de terrain a été réalisée à l'initiative de la Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire de Provence Alpes Côte d'Azur (FRGDS-PACA), en collaboration avec le Laboratoire National de Référence (LNR) pour les Brucelloses Animales de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) de Maisons-Alfort et l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT).

Les objectifs de cette étude sont de sensibiliser les éleveurs aux conséquences économiques et sanitaires de l'épididymite contagieuse et de leur proposer une conduite à tenir pour limiter les pertes et éviter la propagation de la maladie. Les relations entre le statut sérologique des béliers, la qualité de leur fonction sexuelle et l'excrétion de la bactérie dans le sperme seront étudiées et un plan de réforme raisonnée des béliers sera proposé aux éleveurs.

Cette étude a été divisée en deux parties :

- partie 1 : étude des relations entre le statut sérologique vis-à-vis de *B. ovis* des béliers et leur fonction sexuelle
- partie 2 : étude des relations entre les paramètres cliniques et séminologiques, le statut sérologique vis-à-vis de *B. ovis* des béliers et l'excrétion de la bactérie dans le sperme.

Les résultats de la première partie font l'objet d'une thèse réalisée par Christel TROUCHE intitulée « *Etude de la relation entre l'infection par Brucella ovis et la fonction sexuelle des béliers* ». Seront présentés ici les résultats de la deuxième partie de l'étude concernant l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme des béliers.

## **II. Rappels sur l'épididymite contagieuse du bélier**

### **1. Clinique et conséquences technico-économiques**

Les béliers sexuellement matures sont les plus affectés par l'épididymite contagieuse, *B. ovis* pouvant provoquer des épидидymites mais aussi des vésiculites et des dégénérescences testiculaires (FICAPAL *et al.*, 1998 ; CARVALHO JUNIOR *et al.*, 2012). L'ensemble de ces lésions entraîne une diminution de la fertilité des béliers atteints. Néanmoins, l'expression clinique de l'épididymite contagieuse est le plus souvent très discrète, sans signes généraux ni lésions de l'appareil génital. Ainsi, une étude réalisée sur 220 béliers séropositifs vis-à-vis de *B. ovis* révèle que 53,6% de ces béliers ne présentaient aucune anomalie du tractus génital (VAN METRE *et al.*, 2012).

Les brebis sont moins affectées que les béliers mais *B. ovis* peut occasionnellement provoquer des avortements ou des mises bas prématurées (FICAPAL *et al.*, 1998).

Les conséquences économiques sont variables selon la prévalence de l'infection. Il en résulte une diminution de la fertilité globale du troupeau, une diminution du nombre d'agneaux nés, un étalement de la saison d'agnelage et une réforme prématurée des béliers atteints (RIDLER and WEST, 2011).

### **2. Transmission et dynamique de l'infection**

La transmission se fait par contacts directs, lorsque le bélier renifle l'urine d'un autre animal contaminé ou lors de rapports homosexuels (FRANCOIS, 2008). Elle peut aussi avoir lieu de manière indirecte, si les béliers ont sailli les mêmes brebis pendant la saison sexuelle (RIDLER and WEST, 2011).

Il a été montré, sur des béliers infectés expérimentalement, que la séroconversion a lieu en 2 à 5 semaines après inoculation et que l'excrétion de la bactérie dans le sperme débute entre 4 et 9 semaines (RIDLER and WEST, 2011). La majorité des béliers continue à excréter *B. ovis* dans le sperme pendant 2 à 4 ans ; cette excrétion peut être intermittente (BLASCO, 1990).

Chez la brebis, l'infection est transitoire. Ainsi, les femelles ne sont pas considérées comme un élément épidémiologique majeur de cette maladie, excepté leur rôle dans la transmission passive de l'infection d'un bélier à un autre par la saillie.

### 3. Diagnostic

#### 3.1. Diagnostic clinique

Le diagnostic d'épididymite peut être fait par palpation des épидидymes et des testicules, en mettant en évidence des modifications de la forme, de la taille et de la consistance de ces organes.

Cependant, cette méthode ne permet pas d'identifier l'agent infectieux à l'origine de l'épididymite, sachant qu'il en existe plusieurs, les plus courants étant *Brucella ovis*, *Histophilus somni*, et *Actinobacillus seminis*. Les béliers atteints sans lésions de l'appareil génital passent également inaperçus. Or, seulement 35% des béliers infectés ont des lésions détectables par palpation (RIDLER and WEST, 2011).

Le diagnostic de certitude de l'épididymite contagieuse à *B. ovis* nécessite donc des examens de laboratoire.

#### 3.2. Diagnostic de laboratoire

##### 3.2.1. Manipulation de *B. ovis* : danger et risque

- Danger sanitaire pour les espèces animales

*Brucella ovis* ne fait pas partie de la liste des dangers sanitaires de première et de deuxième catégorie pour les espèces animales établie par l'arrêté du 29 juillet 2013, relatif à la définition des dangers sanitaires de première et de deuxième catégorie pour les espèces animales.

Toutes les *Brucella*, à l'exception de *B. ovis* et *B. suis biovar 2*, sont considérées comme des dangers sanitaires de première catégorie pour les espèces animales par ce même arrêté. *B. suis biovar 2* appartient à la liste des dangers sanitaires de deuxième catégorie.

- Risque biologique pour l'Homme

*Brucella ovis* n'est pas un agent de zoonose (FICAPAL *et al.*, 1998) et ne fait pas l'objet de recommandations particulières, d'après la directive 2000/54/CE du parlement européen et du conseil du 18 septembre 2000, concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail.

A titre indicatif, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et *B. canis* sont, d'après cette directive 2000/54/CE, des agents pathogènes du groupe 3. Rappelons qu'un agent pathogène du groupe 3 peut provoquer des maladies graves chez l'homme et constituer un danger pour les travailleurs ; il peut présenter un risque de propagation dans la communauté mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace. La manipulation de ces quatre bactéries doit être effectuée dans un laboratoire ayant un niveau de confinement L3.

### 3.2.2. Méthodes sérologiques

Il existe plusieurs méthodes sérologiques : la réaction de Fixation du Complément (FC), le test ELISA Indirect (I-ELISA) et l'Immunodiffusion sur Gélose (IDG).

La méthode de référence est la réaction de fixation du complément. Cette méthode a une bonne sensibilité et une bonne spécificité mais elle est contraignante à réaliser et incompatible avec des sérums hémolysés ou anti-complémentaires (PRAUD *et al.*, 2012).

Le test ELISA indirect est facile à utiliser et permet d'obtenir un résultat pour les sérums hémolysés et anti-complémentaires. Une étude publiée par PRAUD *et al.* en 2012 sur 4599 sérums de béliers provenant du sud de la France et 3792 sérums de béliers provenant de centres d'insémination démontre que le test I-ELISA est plus sensible et un peu moins spécifique que la FC. Le tableau n°1 récapitule les sensibilités et spécificités des deux méthodes, I-ELISA et FC.

Tableau n°1 : sensibilités et spécificités respectives des méthodes I-ELISA et FC (PRAUD *et al.*, 2012)

| Méthode | Sensibilité | Intervalle de confiance à 95% | Spécificité | Intervalle de confiance à 95% |
|---------|-------------|-------------------------------|-------------|-------------------------------|
| I-ELISA | 0,917       | [0,822-0,992]                 | 0,952       | [0,901-1,0]                   |
| FC      | 0,86        | [0,740-0,967]                 | 0,988       | [0,947-1,0]                   |

Afin de détecter tous les béliers positifs, il est recommandé de réaliser deux tests sérologiques entre 4 et 8 semaines d'intervalle (RIDLER and WEST, 2011) ou de combiner plusieurs méthodes diagnostiques.

### 3.2.3. Méthodes bactériologiques : mise en culture du sperme

La recherche de *B. ovis* se fait par mise en culture des prélèvements de sperme. L'utilisation d'un milieu sélectif approprié, généralement le milieu de Thayer-Martin, est nécessaire car le prélèvement est souvent souillé par des contaminants, tels que des coliformes ou des staphylocoques, qui ont une croissance plus rapide que *B. ovis* (SAUNDERS *et al.*, 2007). Les cultures sont relativement lentes : la croissance de *B. ovis* apparaît au bout de 3 à 4 jours mais il est recommandé d'attendre au minimum une semaine (OIE, 2009).

Cette méthode est considérée comme la technique la plus spécifique pour la détection de *B. ovis*, *A. seminis* et *H. somni* (MANTEROLA *et al.*, 2003).

### 3.2.4. Méthodes moléculaires : Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

La PCR peut également être utilisée pour rechercher la présence de *B. ovis* dans le sperme.

La spécificité de cette méthode est très élevée (OIE, 2008a). En effet, il existe des amorces spécifiques de *B. ovis* (TSOLIS *et al.*, 2009).

La PCR est une méthode hautement sensible car elle est capable d'amplifier plusieurs millions de fois la séquence recherchée. Cette méthode est même considérée comme ayant une sensibilité analytique supérieure à toutes les autres méthodes (OIE, 2008a). De ce fait, une grande attention doit être portée pour éviter une contamination des échantillons, qui peut donner facilement des faux résultats positifs (OIE, 2008b).

### III. Situation épidémiologique vis-à-vis de l'épididymite contagieuse

#### 1. Situation épidémiologique globale

L'épididymite contagieuse du bélier est présente en Amérique, en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Afrique du sud et dans le sud de l'Europe (PRAUD *et al.*, 2012). D'après une étude réalisée par VAN METRE *et al.* en 2012 sur 2200 béliers examinés entre 2000 et 2007, la prévalence dans l'ouest des Etats-Unis est de 10%. Elle est de 51% dans un échantillon de 110 béliers de Catalogne (FICAPAL *et al.*, 1998).

L'Union Européenne (UE) n'a mis en place aucun plan de surveillance systématique de cette affection. Néanmoins, pour limiter la propagation de la maladie, les béliers doivent être séronégatifs en fixation du complément pour être admis en centre d'insémination et pour les échanges internationaux (PRAUD *et al.*, 2012). En élevage, les recommandations sont, dans la mesure du possible, de réformer les animaux séropositifs, de séparer les mâles infectés et les mâles sains et de les utiliser pour la saillie de lots de brebis différents.

En France, en région PACA, jusqu'en 2008, les troupeaux étaient vaccinés avec un vaccin atténué, contenant la souche REV 1 de *B. melitensis*. Expérimentalement, il a été montré que ce vaccin réduit les lésions génitales dues à *B. ovis* mais n'empêche pas l'excrétion de la bactérie et la transmission de la maladie (KOTT *et al.*, 1998). Le nombre de troupeaux infectés a augmenté après l'arrêt, en 2008, de la vaccination (PRAUD *et al.*, 2012). Dans le département des Pyrénées Atlantiques (64), une dérogation pour la vaccination des jeunes béliers de 3 à 6 mois a été obtenue en 2011 pour une durée de 5 ans (rapports du GDS des Pyrénées Atlantiques).

#### 2. Situation épidémiologique en région PACA : point de départ de l'étude

##### 2.1. Mise en évidence de la recrudescence de la maladie

Les vétérinaires de la FRGDS-PACA ont constaté, entre décembre 2008 et avril 2009, une recrudescence de la maladie. C'est au centre des béliers du domaine du Merle que les premières observations ont été réalisées : 167 jeunes béliers ont subi un dépistage sérologique vis-à-vis de *B. ovis* par la méthode I-ELISA (Chekit *B. ovis*, Idexx, France) avant leur mise en vente en décembre 2008. Les résultats de ces tests sont présentés au tableau n°2.

Tableau n°2 : résultats des sérologies (I-ELISA) des 167 jeunes béliers (décembre 2008)

|                  | Nombre de béliers | Pourcentages |
|------------------|-------------------|--------------|
| I-ELISA négatifs | 49                | 29,3%        |
| I-ELISA douteux  | 34                | 20,4%        |
| I-ELISA positifs | <b>84</b>         | <b>50,3%</b> |
| Total            | 167               | 100%         |

Plus de la moitié de ces jeunes béliers étaient séropositifs en I-ELISA vis-à-vis de *B. ovis*. De plus, 6 de ces jeunes béliers présentaient des lésions testiculaires qui ont été analysées au Laboratoire National de Référence pour les Brucelloses Animales de l'ANSES d'Alfort. La bactériologie et la PCR étaient positives vis-à-vis de *B. ovis*.

Un nouveau lot de 161 jeunes béliers d'environ 6 mois, non vaccinés, a été introduit au centre en avril 2009. D'emblée, un dépistage sérologique de *B. ovis*, toujours par la méthode I-ELISA (Chekit *B. ovis*, Idexx, France), a été effectué. Les résultats sont présentés au tableau n°3.

Tableau n°3 : résultats des sérologies (I-ELISA) des 161 jeunes béliers (avril 2009)

|                  | Nombre de béliers | Pourcentages |
|------------------|-------------------|--------------|
| I-ELISA négatifs | 51                | 32%          |
| I-ELISA douteux  | 23                | 14%          |
| I-ELISA positifs | <b>87</b>         | <b>54%</b>   |
| Total            | 161               | 100%         |

Le taux de séropositivité était encore de 54%. Alertée par ces résultats, la FRGDS-PACA a réalisé des campagnes de dépistage sérologique (I-ELISA, Chekit, *B. ovis*, Idexx, France), d'abord sur la base du volontariat, puis de façon quasi-systématique, dans l'ensemble des départements de la région.

## 2.2. Résultats des campagnes de dépistage sérologique

Les résultats des campagnes de dépistage sérologique de 2010 et 2011 sont présentés aux tableaux n°4 et n°5.

Tableau n°4 : résultats de la campagne de dépistage sérologique de 2010

| Département | Elevages dépistés | Béliers dépistés | Béliers négatifs | Béliers douteux | Béliers positifs | Elevages infectés |
|-------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| 04          | 143               | 1568             | 85,6%            | 10,1%           | 4,3%             | 13%               |
| 05          | 509               | 3446             | 89,4%            | 6,5%            | 4,1%             | 13%               |
| 13          | 104               | 2110             | 67,9%            | 12,7%           | <b>19,4%</b>     | <b>47%</b>        |
| 83          | 130               | 987              | 69,2%            | 22,1%           | 8,7%             | 18%               |
| 84          | 9                 | 118              | 82,2%            | 13,6%           | 4,2%             | 33%               |

Tableau n°5 : résultats de la campagne de dépistage sérologique de 2011

| Département | Elevages dépistés | Béliers dépistés | Béliers négatifs | Béliers douteux | Béliers positifs | Elevages infectés |
|-------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| 04          | 387               | 2 500            | 93,5%            | 3,5%            | 3%               | 6%                |
| 05          | 601               | 3 686            | 96,5%            | 1%              | 2,5%             | 5,5%              |
| 13          | 142               | 2 559            | 65%              | 11%             | <b>24%</b>       | <b>53%</b>        |
| 83          | 139               | 813              | 70%              | 18%             | 12%              | 22%               |
| 84          | 33                | 408              | 81%              | 10%             | 9%               | 21%               |

Un élevage est considéré infecté si au moins un des béliers est séropositif vis-à-vis de *B. ovis*.

Tous les départements sont concernés par l'épididymite contagieuse avec des prévalences variables et des pourcentages de béliers séropositifs variables. La situation est particulièrement préoccupante dans les Bouches-du-Rhône (13). En 2011, 53% des élevages de ce département étaient infectés, soit plus d'un élevage sur deux, et 24% des béliers, soit un quart des béliers, étaient séropositifs ! Il s'agit de plus d'une dégradation des résultats par rapport à 2010.

C'est face à cette situation préoccupante que la FRGDS-PACA a initié le projet d'étude sur *B. ovis* qui a pour buts de sensibiliser les éleveurs aux conséquences de cette maladie et de leur proposer un plan de réforme raisonnée des béliers. Les relations entre l'infection par *B. ovis* et la qualité de la fonction sexuelle (clinique et qualité de la semence) des béliers seront étudiées, et plus particulièrement ici, celles entre les paramètres cliniques et séminologiques, le statut sérologique des béliers et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme.

## IV. Matériel et Méthode

### 1. Organisation de l'étude : date, lieu, participants

La partie « terrain » de l'étude a eu lieu du 10 au 15 septembre 2012 à la coopérative PROVALP à Saint-Martin de Crau dans les Bouches-du-Rhône (13) et a impliqué l'ANSES d'Alfort, la FRGDS-PACA, l'ENVT et les éleveurs de la région PACA.

Onze éleveurs de la région PACA, tous concernés par l'épididymite contagieuse dans leurs troupeaux, se sont portés volontaires pour faire partie du projet ; ils ont choisi 218 béliers, utilisés pour la monte naturelle. Le tableau n°6 récapitule l'origine des 218 béliers ayant participé à l'étude.

Tableau n°6 : départements et élevages d'origine des 218 béliers

| Départements                 | Elevages | Nombre de béliers | Total |
|------------------------------|----------|-------------------|-------|
| Alpes de Haute Provence (04) | n°1      | 14                | 33    |
|                              | n°2      | 19                |       |
| Bouches-du-Rhône (13)        | n°3      | 38                | 165   |
|                              | n°4      | 20                |       |
|                              | n°5      | 20                |       |
|                              | n°6      | 13                |       |
|                              | n°7      | 34                |       |
|                              | n°8      | 12                |       |
|                              | n°9      | 28                |       |
| Var (83)                     | n°10     | 8                 | 8     |
| Vaucluse (84)                | n°11     | 12                | 12    |

Afin d'accueillir ces 218 béliers, une bergerie a été aménagée à la coopérative PROVALP, avec des parcs permettant de trier les animaux et des tables pour installer le matériel nécessaire à l'étude (échographe, électro-éjaculateur, etc.). Les béliers devant être examinés dans la journée étaient amenés le matin, ou la veille au soir, et rentraient dans leur élevage le soir même, afin que le lot suivant puisse être reçu.

La présence de personnel était également indispensable, notamment pour assurer la contention des animaux. Ainsi, environ 10 personnes étaient présentes sur place tous les jours pour assurer le bon déroulement de chaque étape de l'étude. Le travail était réparti et organisé pour un maximum d'efficacité, ce qui a permis l'examen de plus de 40 béliers par jour.

### 2. Examen des béliers

Pour chaque bélier, un examen clinique, séminologique et sérologique a été réalisé et de nombreux paramètres ont été renseignés ou mesurés.

#### 2.1. Recueil des commémoratifs

L'élevage et le département d'origine, le numéro d'identification, la race, l'année de naissance et les résultats des dépistages sérologiques des années précédentes ont été enregistrés.

## 2.2. Examen clinique

### 2.2.1. Examen clinique général

Un examen clinique général rapide a été effectué afin d'évaluer l'état général de l'animal ainsi que sa Note d'Etat Corporel (NEC). Les critères utilisés pour établir la NEC sont ceux décrits par SCOTT *et al.* (2001).

### 2.2.2. Examen de l'appareil génital

Une inspection systématique du pénis et du scrotum a été réalisée ainsi qu'une palpation des testicules et des épидидymes. Les béliers pour lesquels des modifications de forme, de taille et de consistance des testicules ou des épидидymes ont été mises en évidence, ont fait l'objet d'un examen échographique de ces organes afin de caractériser les lésions. Quelques béliers ne présentant pas d'anomalie à l'inspection-palpation ont également été échographiés.

La Circonférence Scrotale (CS) a également été mesurée pour chaque bélier. Il s'agit de la mesure, à l'aide d'un mètre ruban, de la plus grande circonférence après avoir fait descendre manuellement les testicules dans le scrotum (PHILIZOT, 2005).

## 3. Récole du sperme et examen séminologique

### 3.1. Récolte du sperme

La semence a été prélevée par électro-éjaculation. Cette étape a nécessité la participation de quatre personnes au minimum. Deux personnes assuraient la contention du bélier pendant que deux autres réalisaient la collecte de la semence de la manière suivante : la première personne procédait à un nettoyage soigneux de la région préputiale à l'aide d'un savon antiseptique iodé (Vétédine savon<sup>ND</sup>, Vétoquinol, France) suivi d'un rinçage abondant à l'eau tiède et d'un séchage avec du papier jetable ; parallèlement, la deuxième personne effectuait un massage transrectal des glandes vésiculaires pour stimuler les sécrétions pré-spermatiques puis introduisait une sonde rectale et appliquait des stimulations électriques d'intensité croissante jusqu'à obtenir l'éjaculation ; la première personne récupérait alors l'éjaculat à l'aide d'un cône de prélèvement et d'un tube Falcon<sup>ND</sup> ; elle essayait également de maintenir le pénis extériorisé au moment de l'érection ou de réaliser une extériorisation manuelle afin d'éviter une éjaculation intrapréputiale.

### 3.2. Examen séminologique

Afin d'éviter que la semence ne se détériore, les premières analyses du sperme ont été réalisées dans les plus brefs délais, en général quelques minutes après la récolte. Pour cela, tout le matériel nécessaire à l'examen séminologique (microscope, spectrophotomètre, etc.) a été installé dans une salle servant de laboratoire à proximité de la bergerie et deux personnes se consacraient à l'analyse des éjaculats.

De plus, les tubes contenant les éjaculats étaient transportés de la bergerie au laboratoire dans un thermos entre 37 et 38°C puis conservés dans un bain-marie, toujours entre 37 et 38°C, jusqu'à leur analyse.

### 3.2.1. Aspects macroscopiques

Les aspects macroscopiques tels que le volume, la couleur, la consistance ou encore la présence d'éléments étrangers (sang, grumeaux, etc.) ont été évalués.

### 3.2.2. Aspects microscopiques

- Concentration

La concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Accuread (IMV Technologies, France).

- Motilité massale

La motilité massale a été évaluée en observant la semence fraîche à l'objectif 10 (grossissement x100). Il s'agit de l'appréciation des mouvements d'ensemble des spermatozoïdes par une note allant de 0 à 5. Le tableau n°7 récapitule les critères d'attribution des notes.

Tableau n°7 : critères de notation pour la motilité massale

| Note | Motilité massale   |
|------|--|
| 0    | Immobilité totale  |
| 1    | Mouvements individualisés                                  |
| 2    | Mouvements très lents, peu ou pas de vagues                |
| 3    | Mouvements généraux de faible amplitude, vagues nombreuses |
| 4    | Mouvements généraux rapides, sans tourbillons              |
| 5    | Mouvements généraux rapides, avec tourbillons (vagues)     |

La note 0 correspond au cas où aucun mouvement n'est observé et la note 5 au cas où des vagues et des tourbillons rapides et intenses sont observés.

- Motilité individuelle

La motilité individuelle a été évaluée en observant la semence fraîche diluée à l'objectif 40 (grossissement x400). Il s'agit d'une estimation du pourcentage de spermatozoïdes mobiles.

- Anomalies des spermatozoïdes

Une goutte de semence a été étalée sur une lame et une coloration à l'éosine-nigrosine a été réalisée. Sur chaque lame ainsi obtenue, les anomalies des spermatozoïdes ont pu être observées en utilisant l'objectif à immersion (grossissement x1000). Les différentes anomalies des spermatozoïdes recherchées sont présentées au tableau n°8.

Tableau n°8 : liste des principales anomalies des spermatozoïdes

|   |  |
|---|--|
| Anomalies de la tête des spermatozoïdes | Têtes seules<br>Têtes minces   |
| Anomalies de la pièce intermédiaire     | Gouttelettes cytoplasmiques proximales<br>Gouttelettes cytoplasmiques distales |
| Anomalies du flagelle                   | Flagelles seuls<br>Flagelles enroulés<br>Flagelles repliés<br>Flagelles cassés |



Les photographies n°1a et n°1b sont des exemples de ce qui a été observé sur deux lames colorées. Sur la photographie n°1a sont visibles, une tête seule, un flagelle replié et un spermatozoïde normal. Sur la photographie n°1b, sont visibles trois spermatozoïdes normaux, une gouttelette cytoplasmique proximale et trois flagelles repliés.



Photographies n°1a et n°1b : exemples de lames colorées (source : ENVVT)

Le pourcentage de spermatozoïdes normaux a été calculé sur un total de 200 cellules. Lors de ce calcul, les flagelles repliés, considérés comme des artéfacts (RON SIN, communication personnelle), n'ont pas été pris en compte.

#### 4. Prélèvements et analyses de laboratoire

##### 4.1. Prélèvement de sang

Une prise de sang à la veine jugulaire a été réalisée sur chaque bélier puis l'échantillon de sang a été envoyé au LNR pour les Brucelloses Animales de l'ANSES d'Alfort, pour analyse sérologique. Deux méthodes ont été utilisées : la réaction de fixation du complément (Norme AFNOR U47-008, lot 2011-01) et le test I-ELISA (Chekit, *B. ovis*, Idexx, France).

##### 4.1.1. Réaction de fixation du complément (FC)

Les seuils de positivité retenus en FC sont présentés au tableau n°9.

Tableau n°9 : seuils en FC

| Catégories     | FC négatifs | FC douteux | FC positifs  |               |                |
|----------------|-------------|------------|--------------|---------------|----------------|
|                |             |            | FC positifs+ | FC positifs++ | FC positifs+++ |
| Seuils (UI/mL) | 0           | ]0-50[     | [50-100[     | [100-200[     | ≥ 200          |

Ces seuils permettent de distinguer 5 catégories de béliers : « FC négatifs », « FC douteux », « FC positifs+ », « FC positifs++ » et « FC positifs+++ ». Les béliers « FC positifs+ », « FC positifs++ » et « FC positifs+++ » peuvent être regroupés en une seule catégorie : « FC positifs ».

*Remarque : le seuil unique de positivité européen retenu pour les échanges intra-communautaires des béliers est de 50 UI/ml.*

#### 4.1.2. Test ELISA indirect (I-ELISA)

Les seuils de positivité retenus en I-ELISA sont présentés au tableau n°10.

Tableau n°10 : seuils en I-ELISA

| Catégories  | ELISA négatifs | ELISA douteux | ELISA positifs  |                  |                   |
|-------------|----------------|---------------|-----------------|------------------|-------------------|
|             |                |               | ELISA positifs+ | ELISA positifs++ | ELISA positifs+++ |
| Seuils (DO) | < 30           | [30-60[       | [60-100[        | [100-200[        | ≥ 200             |

Ces seuils permettent de distinguer 5 catégories de béliers : « ELISA négatifs », « ELISA douteux », « ELISA positifs+ », « ELISA positifs++ » et « ELISA positifs+++ ». Les béliers « ELISA positifs+ », « ELISA positifs++ » et « ELISA positifs+++ » peuvent être regroupés en une seule catégorie : « ELISA positifs ».

#### 4.2. Prélèvement de sperme

Après utilisation pour les examens séminologiques (*cf. supra*), la semence de chaque bélier a été congelée et envoyée au LNR pour les Brucelloses Animales de l'ANSES d'Alfort pour mise en culture et PCR.

Les béliers ont été classés en 3 catégories selon les résultats des PCR, « PCR négatifs », « PCR douteux » et « PCR positifs », et en 2 catégories selon les résultats des cultures, « cultures négatives » et « cultures positives ».

### 5. Classement des béliers

Le classement des béliers en fonction de critères cliniques et de la qualité de leur semence a été une nécessité pour la suite de l'étude.

#### 5.1. Classement des béliers selon la clinique : score clinique

En ce qui concerne la clinique, quatre paramètres sont importants : l'âge, la note d'état corporel (NEC), la circonférence scrotale (CS) et les lésions de l'appareil génital.

##### 5.1.1. Paramètres « âge », « NEC » et « CS »

Pour les paramètres « âge », « NEC » et « CS », les béliers ont reçu une note de 1, 4 ou 7 points, selon si l'animal était jugé respectivement « mauvais », « moyen » ou « bon » par rapport au paramètre considéré, selon le principe proposé par PICARD-HAGEN *et al.* (2013).

Les critères de notation sont ceux utilisés par PICARD-HAGEN *et al.* (2013) et sont récapitulés au tableau n°11.

Tableau n°11 : critères utilisés pour les paramètres cliniques « âge », « NEC » et « CS »

|                |          |         |           |
|----------------|----------|---------|-----------|
| Âge (ans)      | $\geq 5$ | 1       | 2 et 4    |
| NEC            | $< 2$    | $> 3$   | 2 à 3     |
| CS (cm)        | $< 33$   | [33-39[ | $\geq 39$ |
| Catégories     | Mauvais  | Moyens  | Bons      |
| Notes (points) | 1        | 4       | 7         |

Nous avons considéré les animaux dans la force de l'âge (2 à 4 ans), ayant un état d'entretien correct (NEC de 2 à 3) et une CS élevée (CS  $\geq 39$  cm) comme « bons ». Au contraire, les animaux âgés (plus de 5 ans), ayant un état d'entretien insuffisant (NEC  $< 2$ ) et une CS faible (CS  $< 33$  cm) ont été considérés comme « mauvais ».

### 5.1.2. Paramètre « lésions de l'appareil génital »

Les critères de notation choisis pour le paramètre « lésions de l'appareil génital » sont également ceux utilisés par PICARD-HAGEN *et al.* (2013) et sont présentés au tableau n°12.

Tableau n°12 : critères utilisés pour le paramètre clinique « lésions de l'appareil génital »

|               |           |          |
|---------------|-----------|----------|
| Lésions       | Présentes | Absentes |
| Note (points) | 0         | 7        |

Considérant ce paramètre comme plus pénalisant que les autres, la note de 0 a été donnée lorsque des lésions étaient présentes et la note de 7 sinon.

### 5.1.3. Score clinique

Le score clinique est la somme des notes obtenues pour chaque paramètre :

$$\text{Score clinique} = \text{note âge} + \text{note NEC} + \text{note CS} + \text{note lésions}$$

Il permet de classer les béliers selon leur clinique globale en trois catégories, « mauvais », « moyens » et « bons ». Le principe de ce classement est présenté au tableau n°13.

Tableau n°13 : score clinique

|                         |            |
|-------------------------|------------|
| Score clinique (points) | Catégories |
| 3-12                    | Mauvais    |
| 13-21                   | Moyens     |
| 22-28                   | Bons       |

On remarque que la classe « bons » ne contient que des béliers exempts de lésions de l'appareil génital. En effet, un bélier ayant obtenu la note de 7 pour les paramètres « âge », « NEC » et « CS » mais présentant des lésions obtiendra un score de 21 et sera classé « moyen ».

## 5.2. Classement des béliers selon la qualité de la semence : score séminologique

Pour la qualité de la semence, trois paramètres sont importants : la motilité individuelle, les anomalies des spermatozoïdes et la quantité de spermatozoïdes par éjaculat.

### 5.2.1. Paramètres « motilité individuelle », « anomalies des spermatozoïdes » et « quantité de spermatozoïdes par éjaculat »

De la même façon que précédemment, pour chacun de ces paramètres séminologiques, une note de 1, 4 ou 7 points a été attribuée à chaque animal selon si le bélier était jugé respectivement « mauvais », « moyen » ou « bon ».

Les critères utilisés pour classer les béliers dans une des trois catégories sont ceux utilisés par PICARD-HAGEN *et al.* (2013) et sont présentés au tableau n°14.

Tableau n°14 : critères utilisés pour les paramètres séminologiques

|                                     |         |         |      |
|-------------------------------------|---------|---------|------|
| Motilité individuelle (%)           | ≤ 30    | ]30-70] | > 70 |
| Spermatozoïdes normaux (%)          | ≤ 50    | ]50-70] | > 70 |
| Spermatozoïdes/éjaculat (milliards) | ≤ 1     | ]1-2]   | > 2  |
| Catégories                          | Mauvais | Moyens  | Bons |
| Notes (points)                      | 1       | 4       | 7    |

Nous avons considéré comme « bons » les béliers présentant une motilité individuelle élevée (> 70%), une proportion importante de spermatozoïdes normaux (> 70%) et une grande quantité de spermatozoïdes par éjaculat (> 2 milliards de spermatozoïdes). A l'inverse, les béliers ayant des spermatozoïdes peu mobiles (motilité individuelle inférieure ou égale à 30%), en quantité faible (moins d'un milliard de spermatozoïdes par éjaculat) et avec une proportion importante de spermatozoïdes anormaux (moins de 50% de spermatozoïdes normaux) ont été considérés comme « mauvais ».

### 5.2.2. Score séminologique

Le score séminologique est la somme des notes obtenues pour chaque paramètre :

$$\text{Score séminologique} = \text{note motilité individuelle} + \text{note anomalie des spermatozoïdes} + \text{note quantité de spermatozoïdes par éjaculat}$$

Il permet de classer les béliers selon la qualité globale de la semence en trois catégories, « mauvais », « moyens » et « bons ». Le principe de classement est présenté au tableau n°15.

Tableau n°15 : score séminologique

|                              |            |
|------------------------------|------------|
| Score séminologique (points) | Catégories |
| 3-9                          | Mauvais    |
| 12-15                        | Moyens     |
| 18-21                        | Bons       |

## 6. Analyse statistique

L'analyse statistique a fait appel au test exact de Fisher à l'aide du logiciel R. Le seuil de 5% ( $p \leq 0,05$ ) a été retenu comme significatif.

Afin d'obtenir des catégories ayant un effectif suffisant pour permettre l'analyse statistique, les béliers « FC douteux » ont été regroupés avec les béliers « FC négatifs » et le seuil de 45% de DO a été retenu en I-ELISA. De même, les béliers « PCR douteux » ont été regroupés avec les béliers « PCR négatifs ».

## V. Résultats

### 1. Paramètres cliniques

#### 1.1. Age et race

##### 1.1.1. Age

L'âge moyen des béliers était de  $3,3 \pm 1,7$  ans, avec une médiane à 3 ans et une étendue allant de 1 à 9 ans (cf. tableau n°16).

Tableau n°16 : distribution des âges

|           | Moyenne $\pm$ écart-type | Médiane | Minimum | Maximum |
|-----------|--------------------------|---------|---------|---------|
| Age (ans) | $3,3 \pm 1,7$            | 3       | 1       | 9       |

La répartition des béliers par catégories d'âge, selon les critères du paragraphe IV.5.1.1. est présentée au tableau n°17.

Tableau n°17 : répartition des 218 béliers par catégories d'âge

|                         | Nombre de béliers | Pourcentages |
|-------------------------|-------------------|--------------|
| Mauvais (5 ans et plus) | 46                | 21,1%        |
| Moyens (1 an)           | 37                | 17,0%        |
| Bons (entre 2 et 4 ans) | 135               | 61,9%        |
| Total                   | 218               | 100%         |

Il y a 61,9% de béliers considérés comme « bons » ( $n = 135$ ) et 21,1% comme « mauvais » ( $n = 46$ ). La majorité des béliers ( $n = 135$ ) était constituée d'adultes sexuellement mûres, âgés d'entre 2 et 4 ans.

##### 1.1.2. Race

Diverses races étaient représentées : Ile de France, Mérinos d'Arles, Pré Alpes, Charollais, Mérinos de l'Est, Texel, etc. Des croisements étaient également présents.

Le tableau n°18 présente la répartition des béliers par races.

Tableau n°18 : répartition des 218 béliers selon les races

|                     | Nombre de béliers | Pourcentages |
|---------------------|-------------------|--------------|
| Ile de France       | <b>82</b>         | <b>37,6%</b> |
| Mérinos d'Arles     | <b>67</b>         | <b>30,7%</b> |
| Pré Alpes           | 29                | 13,3%        |
| Croisements         | 16                | 7,3%         |
| Charollais          | 8                 | 3,7%         |
| Autres races*       | 8                 | 3,7%         |
| Race non renseignée | 8                 | 3,7%         |
| Total général       | 218               | 100%         |

*\*Mérinos de l'Est, Texel, Espagnol et Commun*

Deux races sont particulièrement représentées : la race Ile de France, avec un effectif de 82 béliers, et la race Mérinos d'Arles (cf. photographie n°2), avec un effectif de 67 béliers.



Photographie n°2 : Mérinos d'Arles (source : ENVT)

## 1.2. Note d'Etat Corporel (NEC)

En moyenne, les béliers avaient une note d'état corporel de  $2,4 \pm 0,7$ , avec une médiane à 2,3 et une étendue allant de 1,3 à 4 (cf. tableau n°19).

Tableau n°19 : distribution des NEC

|     | Moyenne $\pm$ écart-type | Médiane | Minimum | Maximum |
|-----|--------------------------|---------|---------|---------|
| NEC | $2,4 \pm 0,7$            | 2,3     | 1,3     | 3,8     |

Les élevages n°1 et n°11 obtiennent une NEC moyenne plus élevée que les autres élevages. En effet, les béliers de l'élevage n°1 avaient une NEC de  $3,8 \pm 0,3$  en moyenne et ceux de l'élevage n°11, une NEC de  $3,4 \pm 0,3$  en moyenne.

Les proportions de béliers par catégories de NEC selon les critères du paragraphe IV.5.1.1. sont présentées au tableau n°20.

Tableau n°20 : répartition des 218 béliers par catégories de NEC

|                         | Nombre de béliers | Pourcentages |
|-------------------------|-------------------|--------------|
| Mauvais (NEC < 2)       | 60                | 27,5%        |
| Moyens (NEC > 3)        | 30                | 13,8%        |
| Bons (NEC entre 2 et 3) | 126               | 57,8%        |
| NEC non mesurées        | 2                 | 0,9%         |
| Total                   | 218               | 100%         |

La majorité des béliers ( $n = 126$ ) avait un bon état d'entretien, avec une NEC comprise entre 2 et 3, mais plus de 25% des animaux ( $n = 60$ ) étaient en mauvais état corporel.

### 1.3. Circonférence Scrotale (CS)

En moyenne, la circonférence scrotale des béliers était de  $36,4 \pm 3,6$  cm. La médiane était de 34 cm et l'étendue allait d'un minimum de 26 cm à un maximum de 46 cm (cf. tableau n°21).

Tableau n°21 : distribution des CS

|         | Moyenne $\pm$ écart-type | Médiane | Minimum | Maximum |
|---------|--------------------------|---------|---------|---------|
| CS (cm) | $36,4 \pm 3,6$           | 34      | 26      | 46      |

La répartition des béliers par catégories de CS selon les critères du paragraphe IV.5.1.1. est présentée au tableau n°22.

Tableau n°22 : répartition des 218 béliers par catégories de CS

|                               | Nombre de béliers | Pourcentages |
|-------------------------------|-------------------|--------------|
| Mauvais (CS < 33 cm)          | 31                | 14,2%        |
| Moyens (CS entre 33 et 39 cm) | 119               | 54,6%        |
| Bons (CS $\geq$ 39 cm)        | 62                | 28,4%        |
| CS non mesurées               | 6                 | 2,8%         |
| Total                         | 218               | 100%         |

Il y a 28,4% des béliers considérés comme « bons » ( $n = 62$ ) et 14,2% comme « mauvais » ( $n = 31$ ). La majorité des béliers ( $n = 119$ ) avait une circonférence scrotale comprise entre 33 et 39 cm.

### 1.4. Lésions de l'appareil génital

Les lésions concernaient soit les épидидymes, soit les testicules. Quelques béliers présentaient des lésions du scrotum ou du prépuce. Le tableau n°23 présente la répartition des lésions observées sur les différents organes de l'appareil génital.

Tableau n°23 : lésions de l'appareil génital

|                       | Nombre de béliers | Pourcentages |
|-----------------------|-------------------|--------------|
| Sains                 | 145               | 66,5%        |
| Lésions épидидymaires | 49                | 22,5%        |
| Lésions testiculaires | 21                | 9,6%         |
| Lésions scrotales     | 2                 | 0,9%         |
| Lésions préputiales   | 1                 | 0,5%         |
| Total                 | 218               | 100%         |

Sur les 218 béliers, 145 ne présentaient pas de lésions de l'appareil génital et ont donc été considérés comme « sains ». Les 73 autres béliers présentaient des lésions de l'appareil génital.

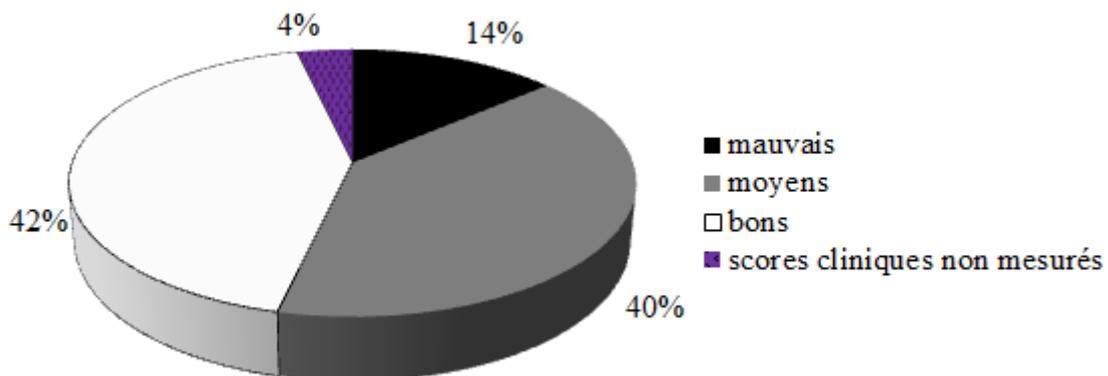
Les principales lésions testiculaires observées étaient des indurations, des atrophies et des dégénérescences ou des asymétries testiculaires (cf. photographie n°3a). Notons qu'un des béliers présentait une hypoplasie des deux testicules. Les principales lésions épидидymaires observées étaient des nodules, des kystes ou des hypertrophies de l'épididyme (cf. photographie n°3b). Des hyperkératoses du scrotum et des lésions préputiales ont également été observées.



Photographies n°3a et n°3b : 3a, dégénérescence ou asymétrie testiculaire ; 3b, inflammation de l'épididyme (cf. flèche) (source : ENVT)

### 1.5. Score clinique

Le score clinique a été calculé selon les critères exposés paragraphe IV.5.1.3. Compte tenu des modalités de calcul, il n'a pas été possible de l'obtenir pour 8 béliers, pour lesquels les paramètres NEC ou CS n'étaient pas renseignés correctement. La répartition des béliers selon leur statut clinique global est présentée sur le graphe n°1.



Graphe n°1 : répartition des scores cliniques des 218 béliers

Seuls 42% des béliers (n = 93) présentaient un « bon » score clinique ; plus de la moitié des béliers était constituée d'individus « mauvais » (n = 30) ou « moyens » (n = 87).

En annexe N°I sont présentés les résultats moyens par élevage pour les paramètres cliniques (âge, NEC, CS et score clinique).

## 2. Paramètres séminologiques

### 2.1. Motilité individuelle

En moyenne, la motilité individuelle obtenue était de  $48,9 \pm 29,9\%$ . La médiane était de 57,5% et l'étendue de 0 à 90% (cf. tableau n°24).

Tableau n°24 : distribution des motilités individuelles

|                           | Moyenne $\pm$ écart-type | Médiane | Minimum | Maximum |
|---------------------------|--------------------------|---------|---------|---------|
| Motilité individuelle (%) | $48,9 \pm 29,9\%$        | 57,5%   | 0%      | 90%     |

La répartition des béliers par catégories de motilité individuelle selon les critères du paragraphe IV.5.2.1. est présentée au tableau n°25.

Tableau n°25 : répartition des 218 béliers par catégories de motilité individuelle

|                          | Nombre de béliers | Pourcentages |
|--------------------------|-------------------|--------------|
| Mauvais ( $\leq 30\%$ )  | 68                | 31,2%        |
| Moyens (entre 30 et 70%) | 67                | 30,7%        |
| Bons ( $> 70\%$ )        | 83                | 38,1%        |
| Total                    | 218               | 100%         |

Il y a 38,1% des béliers considérés comme « bons » ( $n = 83$ ) et 31,2% comme « mauvais » ( $n = 68$ ). Plus de la moitié des béliers est classée dans les catégories « moyens » ( $n = 67$ ) ou « mauvais » ( $n = 68$ ). Notons que pour 25 béliers, la motilité individuelle était de 0%.

Les résultats concernant les motilités massales sont présentés en annexe N°II et ne sont pas utilisés par la suite.

### 2.2. Quantité de spermatozoïdes par éjaculat

En moyenne, un éjaculat contenait  $1,9 \pm 1,8$  milliards de spermatozoïdes. La médiane est de 1,3 milliards de spermatozoïdes par éjaculat, l'étendue de 0,004 à 8,9 milliards de spermatozoïdes par éjaculat (cf. tableau n°26).

Tableau n°26 : distribution des quantités de spermatozoïdes par éjaculat

|   | Moyenne $\pm$ écart-type | Médiane | Minimum | Maximum |
|---|--------------------------|---------|---------|---------|
| Quantité de spermatozoïdes par éjaculat (milliards) | $1,9 \pm 1,8$            | 1,3     | 0,004   | 8,9     |

La répartition des béliers par catégories de quantité de spermatozoïdes par éjaculat selon les critères du paragraphe IV.5.2.1. est présentée au tableau n°27.

Tableau n°27 : répartition des 218 béliers par catégories de quantité de spermatozoïdes par éjaculat

|                                | Nombre de béliers | Pourcentages |
|--------------------------------|-------------------|--------------|
| Mauvais ( $\leq 1$ milliard)   | 88                | 40,4%        |
| Moyens (entre 1et 2 milliards) | 58                | 26,6%        |
| Bons ( $> 2$ milliards)        | 70                | 32,1%        |
| Quantités non mesurée          | 2                 | 0,9%         |
| Total                          | 218               | 100%         |

Près d'un tiers des béliers a présenté un éjaculat considéré comme « bon » ( $n = 70$ ). La majorité des béliers était constituée d'animaux soit « mauvais » ( $n = 88$ ) soit « moyens » ( $n = 58$ ).

### 2.3. Anomalies des spermatozoïdes

En moyenne,  $29,2 \pm 22,5\%$  de spermatozoïdes anormaux étaient observés par lame. La médiane était de 21,3% de spermatozoïdes anormaux par lame et l'étendue allait de 1,5% à 97,4% de spermatozoïdes anormaux par lame (cf. tableau n°28).

Tableau n°28 : distribution des anomalies des spermatozoïdes (pourcentages de spermatozoïdes anormaux et normaux)

|                             | Moyenne $\pm$ écart-type | Médiane | Minimum | Maximum |
|-----------------------------|--------------------------|---------|---------|---------|
| Spermatozoïdes anormaux (%) | $29,2 \pm 22,5\%$        | 21,3%   | 1,5%    | 97,4%   |
| Spermatozoïdes normaux (%)  | $70,8 \pm 22,5\%$        | 78,7%   | 2,6%    | 98,5%   |

Le détail des différents types d'anomalies des spermatozoïdes observées est présenté au tableau n°29.

Tableau n°29 : distribution des différents types d'anomalies des spermatozoïdes

| Anomalies des spermatozoïdes (en pourcentages par lame) | Moyenne $\pm$ écart-type            | Médiane | Maximum |
|---|-------------------------------------|---------|---------|
| Têtes seules  | <b><math>10,8 \pm 14,6\%</math></b> | 4,1%    | 80,7%   |
| Têtes minces  | $0,1 \pm 0,4\%$                     | 0%      | 4,0%    |
| Gouttelettes cytoplasmiques proximales                  | $0,4 \pm 1,6\%$                     | 0%      | 19,5%   |
| Gouttelettes cytoplasmiques distales                    | $0,1 \pm 0,6\%$                     | 0%      | 6,1%    |
| Flagelles seuls   | $5,2 \pm 7,3\%$                     | 1,6%    | 38,5%   |
| Flagelles repliés                                       | $7,6 \pm 7,2\%$                     | 5,6%    | 51,5%   |
| Flagelles enroulés                                      | $3,8 \pm 4,8\%$                     | 2,0%    | 28,5%   |
| Flagelles cassés  | $1,2 \pm 1,5\%$                     | 0,5%    | 8,0%    |

La répartition des béliers par catégories d'anomalies des spermatozoïdes selon les critères du paragraphe IV.5.2.1. est présentée au tableau n°30.

Tableau n°30 : répartition des 218 béliers par catégories d'anomalies des spermatozoïdes (pourcentages de spermatozoïdes normaux)

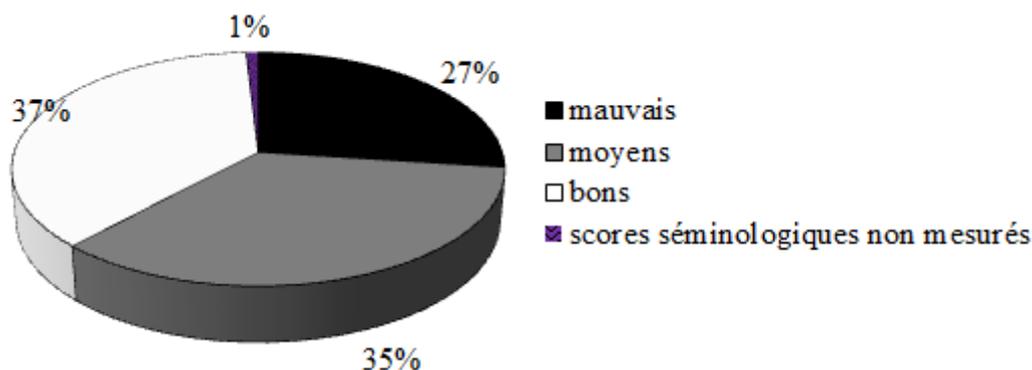
|                          | Nombre de béliers | Pourcentages |
|--------------------------|-------------------|--------------|
| Mauvais ( $\leq 50\%$ )  | 31                | 14,2%        |
| Moyens (entre 50 et 70%) | 36                | 16,5%        |
| Bons ( $> 70\%$ )        | 151               | 69,3%        |
| Total                    | 218               | 100%         |

Près de 70% des béliers ont été considérés comme « bons » ( $n = 151$ ) et 14,2% comme « mauvais » ( $n = 31$ ). Notons que 7 béliers azoospermiques ont été classés dans la catégorie « mauvais ».

#### 2.4. Qualité de la semence (score séminologique)

Le score séminologique a été déterminé selon les critères exposés au paragraphe IV.5.2.2. Il n'a pas pu être calculé pour 2 béliers, pour lesquels la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat n'était pas renseignée.

La répartition des béliers selon la qualité globale de leur semence est présentée sur le graphe n°2.



Graphe n°2 : répartition des scores séminologiques des 218 béliers

Un peu plus d'un tiers des béliers ( $n = 81$ , soit 37,2%) a présenté un score séminologique considéré comme « bon ». Les béliers classés « mauvais » ( $n = 59$ ) et « moyens » ( $n = 76$ ) représentent plus de la moitié de l'effectif.

En annexe N°I sont présentés les résultats moyens par élevage pour les paramètres séminologiques (motilité individuelle, quantité de spermatozoïdes par éjaculat, anomalies des spermatozoïdes et score séminologique).

### 3. Données sérologiques préalables à l'étude

Pour une partie des béliers participant à l'étude, nous disposons des données sérologiques (méthode I-ELISA, Chekit *B. ovis*, Idexx, France) obtenues lors des campagnes de dépistage effectuées par la FRGDS-PACA, en 2010, 2011 et 2012.

#### 3.1. Données sérologiques pour les années 2010, 2011 et 2012

En 2010, seulement 83 béliers participants à l'étude avaient été testés. Le taux de séropositivité obtenu était de **46%**.

En 2011, 113 béliers participant à l'étude avaient été testés. Le taux de séropositivité obtenu était de **61%**.

En 2012, 192 béliers participant à l'étude avaient déjà été testés. Le taux de séropositivité obtenu était de **48%**.

#### 3.2. Fluctuations sérologiques pour la période 2010-2012

Le tableau n°31 présente les fluctuations sérologiques entre les données pour 2010 et 2012.

Tableau n°31 : relation entre les résultats des analyses sérologiques réalisées en 2010 et en 2012

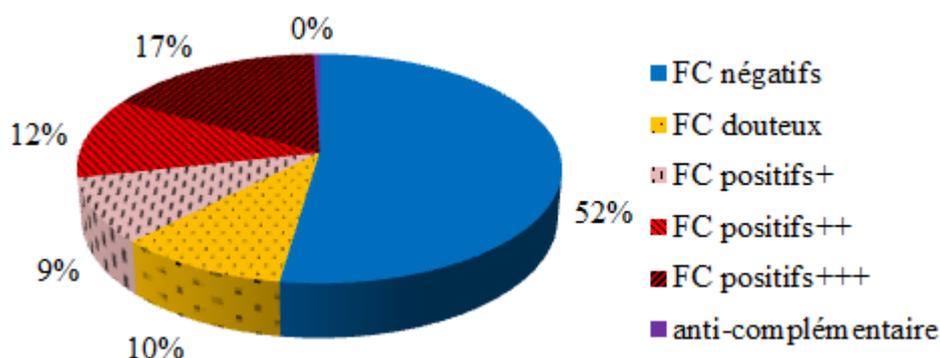
| Nombre de béliers     | I-ELISA négatifs 2012 | I-ELISA douteux 2012 | I-ELISA positifs 2012 | Non testés 2012 | Total |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------|-------|
| I-ELISA négatifs 2010 | 19                    | 4                    | <b>8</b>              | 2               | 33    |
| I-ELISA douteux 2010  | 2                     | 0                    | 0                     | 0               | 2     |
| I-ELISA positifs 2010 | <b>1</b>              | 2                    | 27                    | 0               | 30    |
| Non testés 2010       | 62                    | 10                   | 57                    | 24              | 153   |
| Total                 | 84                    | 16                   | 92                    | 26              | 218   |

Nous constatons que 8 béliers séronégatifs en I-ELISA vis-à-vis de *B. ovis* en 2010 sont séropositifs en 2012. D'autre part, un bélier séropositif en 2010 est séronégatif en 2012.

## 4. Résultats des analyses sérologiques de septembre 2012

### 4.1. Résultats obtenus en FC

Les résultats des 218 béliers en FC sont présentés sur le graphe n°3.

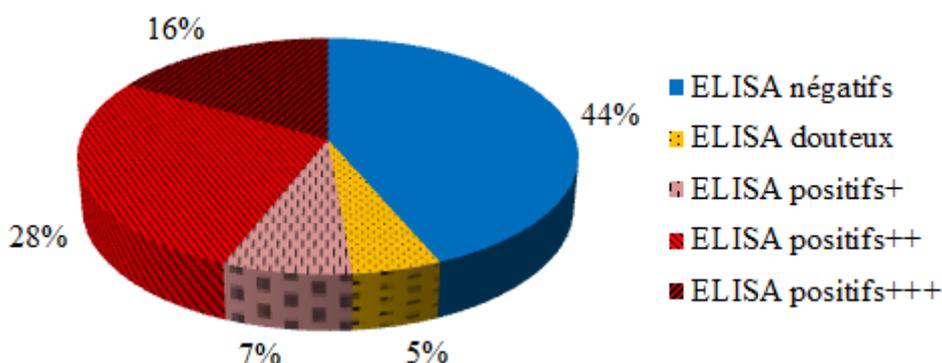


Graphique n°3 : répartition des résultats de FC des 218 béliers

Un bélier présente un sérum anti-complémentaire. Le taux de séropositivité en FC est de **37,2%** avec 16,5% des béliers fortement positifs en FC (« FC positifs+++ »).

### 4.2. Résultats obtenus en I-ELISA

Les résultats des 218 béliers en I-ELISA sont présentés sur le graphe n°4.



Graphique n°4 : répartition des résultats d'I-ELISA des 218 béliers

Le taux de séropositivité en I-ELISA est de **51,4%** avec 16,5% des béliers fortement positifs (« ELISA positifs+++ »).

### 4.3. Fluctuations sérologiques pendant l'année 2012

Le tableau n°32 présente les fluctuations sérologiques (I-ELISA) entre les données préalables à l'étude et les données obtenues au moment de l'étude.

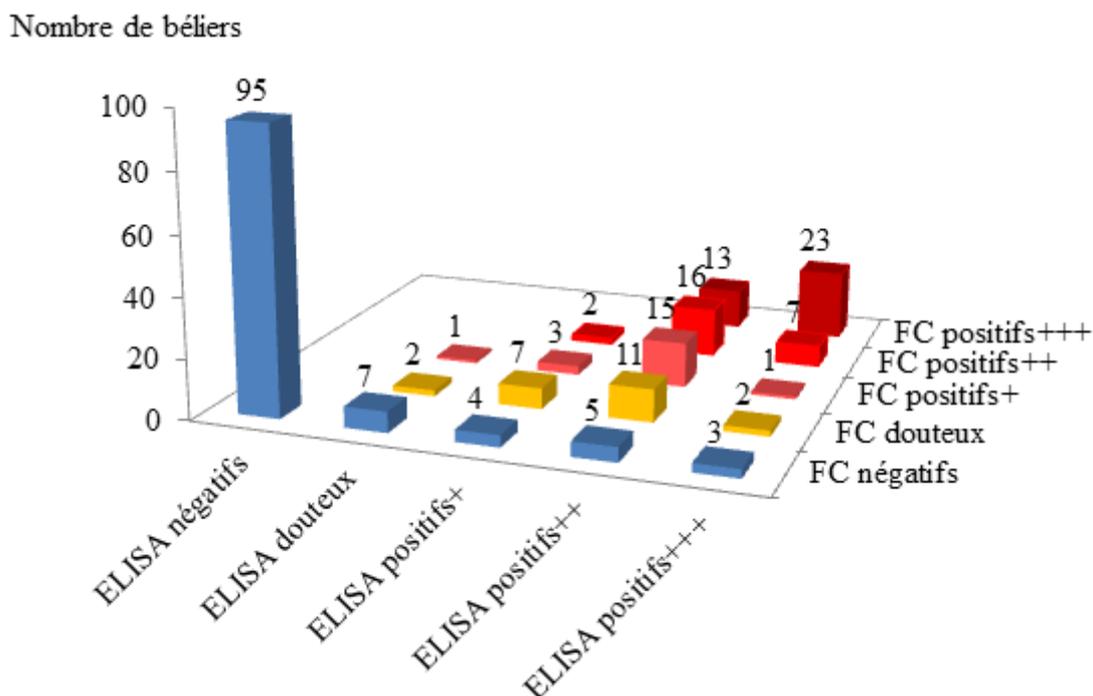
Tableau n°32 : relation entre les résultats des analyses sérologiques réalisées en 2012

| Nombre de béliers                | I-ELISA négatifs 2012 | I-ELISA douteux 2012 | I-ELISA positifs 2012 | Total |
|----------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------|
| I-ELISA négatifs (avant l'étude) | 67                    | 2                    | <b>15</b>             | 84    |
| I-ELISA douteux (avant l'étude)  | 11                    | 2                    | 3                     | 16    |
| I-ELISA positifs (avant l'étude) | <b>3</b>              | 6                    | 83                    | 92    |
| Total                            | 81                    | 10                   | 101                   | 192   |

Au cours de l'année 2012, nous remarquons que 15 béliers séronégatifs en I-ELISA vis-à-vis de *B. ovis* avant l'étude sont séropositifs au moment de l'étude. Inversement, 3 séronégativations sont constatées pendant cette période.

#### 4.4. Relation entre les résultats en FC et en I-ELISA

Le graphe n°5 et le tableau n°33 présentent la relation entre les résultats en FC et en I-ELISA.



Graphique n°5 : relation entre les résultats en FC et en I-ELISA

Tableau n°33 : relation entre les résultats en FC et en I-ELISA, en pourcentage de l'effectif total

| Pourcentages<br>(effectif total, n = 217) | FC<br>négatifs | FC<br>douteux | FC<br>positifs+ | FC<br>positifs++ | FC<br>positifs+++ | Total |
|---|----------------|---------------|-----------------|------------------|-------------------|-------|
| I-ELISA négatifs                          | <b>43,8%</b>   | 0%            | 0%              | 0%               | 0%                | 43,8% |
| I-ELISA douteux                           | 3,2%           | <b>0,9%</b>   | 0,5%            | 0%               | 0%                | 4,6%  |
| I-ELISA positifs+                         | 1,8%           | 3,2%          | <b>1,4%</b>     | 0,9%             | 0%                | 7,4%  |
| I-ELISA positifs++                        | 2,3%           | 5,1%          | 6,9%            | <b>7,4%</b>      | 6,0%              | 27,6% |
| I-ELISA positifs+++                       | 1,4%           | 0,9%          | 0,5%            | 3,2%             | <b>10,6%</b>      | 16,6% |
| Total                                     | 52,5%          | 10,1%         | 9,2%            | 11,5%            | 16,6%             | 100%  |

Il semble y avoir une bonne corrélation entre les résultats des deux méthodes sérologiques, FC et I-ELISA. Nous constatons par exemple que 95 béliers, soit 43,8% de l'effectif total (n = 217), sont séronégatifs, à la fois en FC et en I-ELISA. De même, 23 béliers, soit 10,6% de l'effectif total (n = 217), sont fortement séropositifs en FC et en I-ELISA. Au total, **64,1%** des béliers obtiennent des résultats concordants par les deux méthodes sérologiques.

Des exceptions existent : 12 béliers sont séropositifs en I-ELISA (« ELISA positifs ») et séronégatifs en FC (« FC négatifs »). Parmi ces béliers, 3 sont fortement séropositifs en I-ELISA (« ELISA positifs+++ »). Aucun bélier séronégatif en I-ELISA (« ELISA négatifs ») n'est séropositif en FC (« FC négatifs »).

Les résultats de l'analyse statistique relative à l'étude de la relation entre FC et I-ELISA sont présentés au tableau n°34. Comme expliqué paragraphe IV.6., les béliers « FC douteux » ont été regroupés avec les béliers « FC négatifs » et le seuil de 45% de DO a été retenu pour l'I-ELISA.

Tableau n°34 : statistiques relatives à l'étude de la relation entre FC et I-ELISA

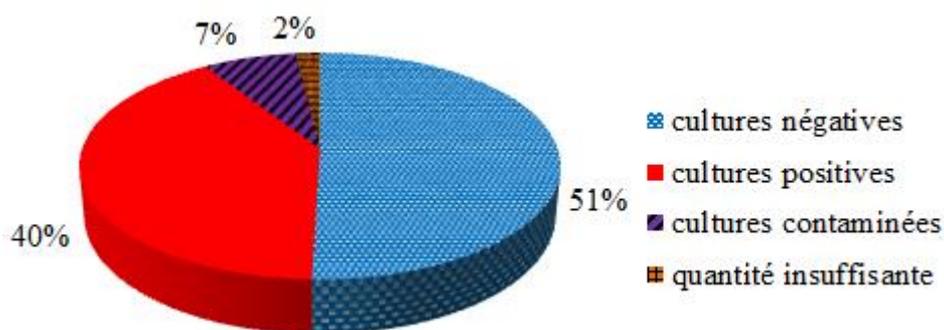
| Eléments comparés   | Test exact de Fisher  |
|---|-----------------------|
| <b>FC (négatifs et positifs) et I-ELISA 45 (négatifs et positifs)</b> | <b>p &lt; 2,2e-16</b> |

L'analyse statistique montre qu'il existe des différences significatives entre les résultats en FC et en I-ELISA ( $p < 0,05$ ). Plus de résultats positifs sont obtenus avec la méthode I-ELISA, plus sensible que la FC.

## 5. Résultats des cultures et des PCR

### 5.1. Résultats des cultures

Les résultats des cultures pour les 218 béliers sont présentés sur le graphe n°6.

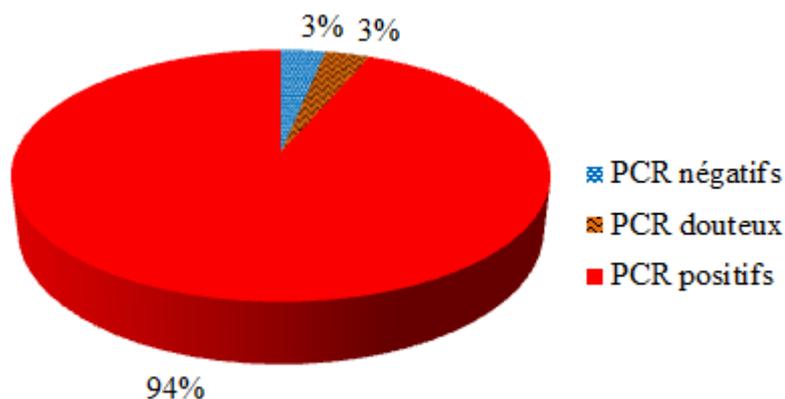


Graphique n°6 : résultats des cultures pour les 218 béliers

Le taux de cultures positives est de **40,4%**.

### 5.2. Résultats des PCR

Les résultats des PCR des 218 béliers sont présentés sur le graphe n°7.

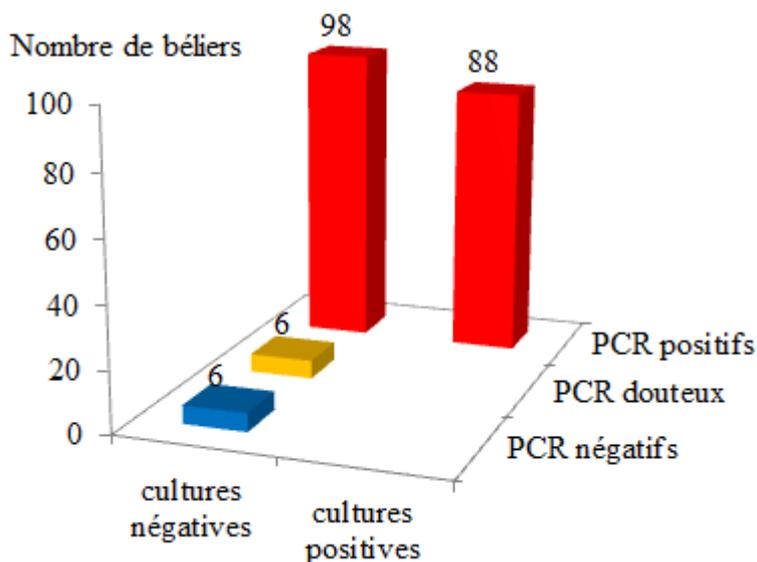


Graphique n°7 : résultats des PCR des 218 béliers

Le taux de positivité en PCR est de **93,6%** ! Seulement 14 béliers sont négatifs ou douteux.

### 5.3. Relation entre les résultats des cultures et des PCR

Le graphe n°8 et le tableau n°35 présentent la relation entre les résultats des cultures et des PCR.



Graphique n°8 : relation entre les résultats des cultures et des PCR

Tableau n°35 : relation entre les résultats des cultures et des PCR, en pourcentage du total par catégories de cultures

| Pourcentages (catégories de cultures) | PCR négatifs | PCR douteux | PCR positifs | Total |
|---------------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------|
| Cultures négatives                    | 5,5%         | 5,5%        | <b>89,1%</b> | 100%  |
| Cultures positives                    | 0%           | 0%          | 100%         | 100%  |

Un problème majeur est mis en évidence : 89,1% des cultures négatives correspondent à un résultat positif en PCR. 98 béliers sont concernés, soit 49,5% de l'effectif total (n = 198).

Les résultats de l'analyse statistique relative à l'étude de la relation entre cultures et PCR sont présentés au tableau n°36. Comme expliqué au paragraphe IV.6., les béliers « PCR douteux » ont été regroupés avec les béliers « PCR négatifs ».

Tableau n°36 : statistiques relatives à l'étude de la relation entre cultures et PCR

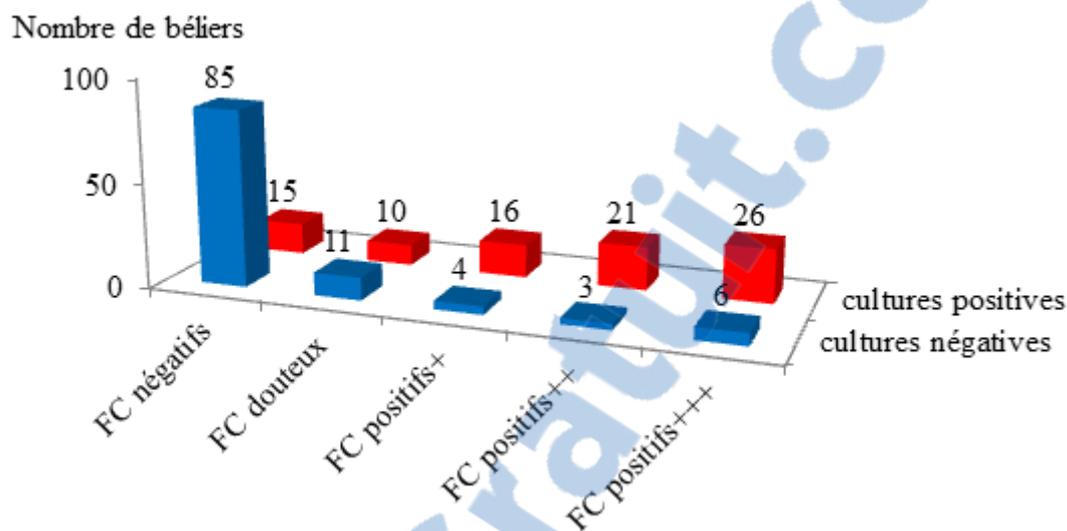
| Eléments comparés                             | Test exact de Fisher |
|---|----------------------|
| <b>Cultures et PCR (négatifs et positifs)</b> | <b>p = 0,00069</b>   |

L'analyse statistique montre qu'il existe des différences significatives entre les résultats des cultures et des PCR. Ces différences sont liées au fort taux de positivité, 93,9%, obtenu en PCR.

## 6. Relations entre statut sérologique des béliers (FC et I-ELISA) et excrétion de *B. ovis* dans le sperme (cultures et PCR)

### 6.1. Relation entre FC et cultures

Le graphe n°9 et le tableau n°37 présentent la relation entre le statut sérologique des béliers en FC et les cultures.



Graphique n°9 : relation entre statut sérologique des béliers en FC et cultures

Tableau n°37 : relation entre statut sérologique des béliers en FC et cultures, en pourcentage de l'effectif total

| Pourcentages<br>(effectif total, n = 197) | Cultures négatives | Cultures positives | Total |
|---|--------------------|--------------------|-------|
| FC négatifs                               | <b>43,1%</b>       | 7,6%               | 50,8% |
| FC douteux                                | 5,6%               | 5,1%               | 10,7% |
| FC positifs+                              | 2,0%               | <b>8,1%</b>        | 10,2% |
| FC positifs++                             | 1,5%               | <b>10,7%</b>       | 12,2% |
| FC positifs+++                            | 3,0%               | <b>13,2%</b>       | 16,2% |
| Total                                     | 55,3%              | 44,7%              | 100%  |

Il semble y avoir une bonne relation entre les résultats des deux méthodes, FC et cultures : 85 béliers, soit 43,1% de l'effectif total (n = 197), sont séronégatifs et ont des cultures négatives ; 26 béliers, soit 13,2% de l'effectif total (n = 197), sont fortement séropositifs et ont des cultures positives. Nous constatons au final que **75,1%** des béliers obtiennent des résultats concordants avec les deux méthodes.

Des exceptions existent : 13 béliers séropositifs en FC (« FC positifs »), soit 6,5% de l'effectif total (n = 197), ont des cultures négatives. Parmi ces béliers, 6 sont fortement séropositifs en FC (« FC positifs+++ »). D'autre part, 15 béliers séronégatifs en FC (« FC négatifs »), soit 7,6% de l'effectif total (n = 197), ont des cultures positives.

Les résultats de l'analyse statistique relative à l'étude de la relation entre FC et cultures sont présentés au tableau n°38. Les béliers « FC douteux » ont été regroupés avec les béliers « FC négatifs » (cf. paragraphe IV.6.). Dans un second temps, seuls les béliers séropositifs en FC, à différents degrés (« FC positifs+++ », « FC positifs++ » et « FC positifs+ »), ont été considérés.

Tableau n°38 : statistiques relatives à l'étude de la relation entre FC et cultures

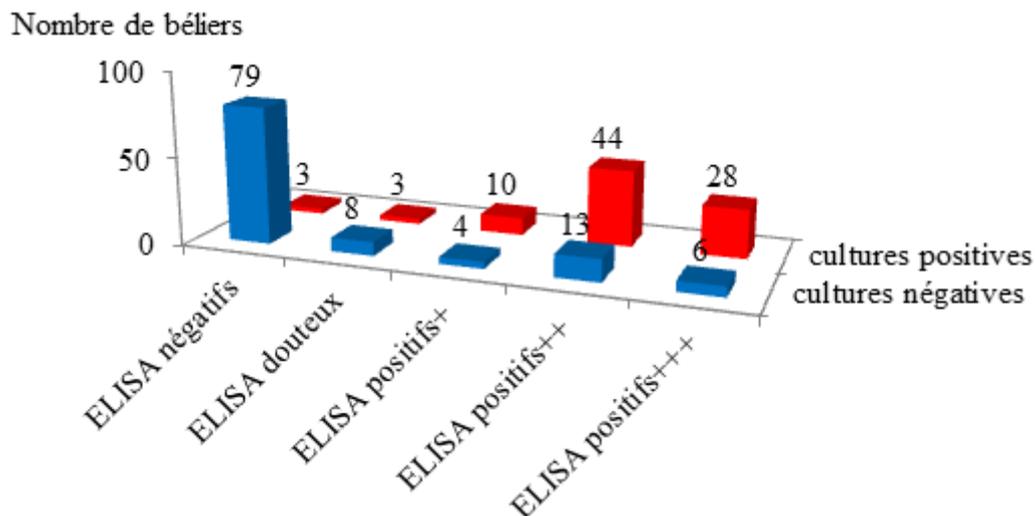
| Eléments comparés  | Test exact de Fisher  |
|--|-----------------------|
| <b>FC (négatifs et positifs) et cultures</b>               | <b>p &lt; 2,2e-16</b> |
| <b>FC (positifs+, positifs++, positifs+++)</b> et cultures | p = 0,7963            |

L'analyse statistique montre l'existence d'une relation significative entre FC et cultures ( $p < 0,05$ ). **Les béliers séropositifs en FC excrètent significativement plus *B. ovis* que les béliers séronégatifs.**

Si on ne considère maintenant que les béliers séropositifs en FC, à différents degrés, l'analyse statistique ne montre pas de relation significative entre le degré de séropositivité en FC et les cultures ( $p > 0,05$ ). **Les béliers fortement séropositifs en FC (« FC positifs+++ ») n'excrètent donc pas significativement plus la bactérie que les béliers faiblement ou moyennement séropositifs (« FC positifs+ » ou « FC positifs++ »).** Il n'y a pas de relation entre l'intensité de la réaction sérologique en FC et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme.

## 6.2. Relation entre I-ELISA et cultures

Le graphe n°10 et le tableau n°39 présentent la relation entre le statut sérologique des béliers en I-ELISA et les cultures.



Graphe n°10 : relation entre statut sérologique des béliers en I-ELISA et cultures

Tableau n°39 : relation entre statut sérologique des béliers en I-ELISA et cultures, en pourcentage de l'effectif total

| Pourcentages (effectif total, n = 198) | Cultures négatives | Cultures positives | Total |
|--|--------------------|--------------------|-------|
| I-ELISA négatifs                       | <b>39,9%</b>       | 1,5%               | 41,4% |
| I-ELISA douteux                        | 4,0%               | 1,5%               | 5,6%  |
| I-ELISA positifs+                      | 2,0%               | <b>5,1%</b>        | 7,1%  |
| I-ELISA positifs++                     | 6,6%               | <b>22,2%</b>       | 28,8% |
| I-ELISA positifs+++                    | 3,0%               | <b>14,1%</b>       | 17,2% |
| Total                                  | 55,6%              | 44,4%              | 100%  |

Il semble y avoir une bonne corrélation entre les résultats des deux méthodes, I-ELISA et cultures : 79 béliers, soit 39,9% de l'effectif total (n = 198), sont séronégatifs en I-ELISA et ont des cultures négatives ; 28 béliers, soit 14,1% de l'effectif total (n = 198), sont fortement séropositifs en I-ELISA et ont des cultures positives. Au total, **81%** des béliers obtiennent des résultats concordants par les deux méthodes.

Cependant, des exceptions existent : 23 béliers, soit 11,6% de l'effectif total (n = 198), sont séropositifs en I-ELISA (« ELISA positifs ») et ont des cultures négatives. Parmi ces béliers, 6 sont fortement séropositifs en I-ELISA (« ELISA positifs+++ »). D'autre part, 3 béliers, soit 1,5% de l'effectif total (n = 198), sont séronégatifs en I-ELISA (« ELISA négatifs ») et ont des cultures positives.

Les résultats de l'analyse statistique relative à l'étude de la relation entre I-ELISA et cultures sont présentés au tableau n°40. Pour l'I-ELISA, le seuil de 45% de DO a été retenu pour répartir les béliers « ELISA douteux » dans les catégories « ELISA négatifs » et « ELISA positifs » (cf. paragraphe IV.6.). Dans un second temps, seuls les béliers séropositifs en I-ELISA, à différents degrés (« ELISA positifs+++ », « ELISA positifs++ » et « ELISA positifs+ »), ont été considérés.

Tableau n°40 : statistiques relatives à l'étude de la relation entre I-ELISA et cultures

| Eléments comparés   | Test exact de Fisher  |
|---|-----------------------|
| <b>I-ELISA 45</b> (négatifs, positifs) et <b>cultures</b>               | <b>p &lt; 2,2e-16</b> |
| <b>I-ELISA</b> (positifs+, positifs++, positifs+++ ) et <b>cultures</b> | p = 0,601             |

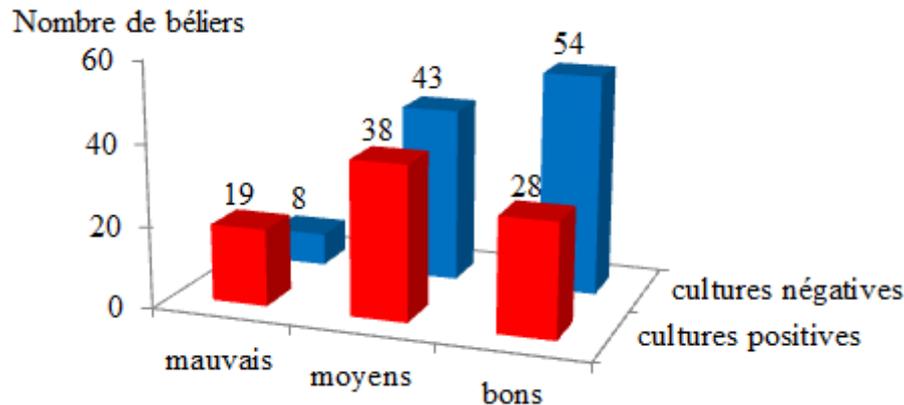
L'analyse statistique montre l'existence d'une relation significative entre l'I-ELISA et les cultures (p < 0,05). **Les béliers séropositifs en I-ELISA excrètent significativement plus *B. ovis* que les béliers séronégatifs.**

Si on ne considère maintenant que les béliers séropositifs en I-ELISA, à différents degrés, l'analyse statistique ne montre pas de relation significative entre le degré de séropositivité en I-ELISA et les cultures (p > 0,05). **Les béliers fortement séropositifs en I-ELISA (« ELISA positifs+++ ») n'excrètent donc pas significativement plus la bactérie que les béliers faiblement et moyennement séropositifs (« ELISA positifs+ » et « ELISA positifs++ »).** Il n'y a pas non plus de relation entre l'intensité de la réaction sérologique en I-ELISA et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme.

Les relations entre le statut sérologique des béliers et les PCR sont présentées en annexe N°III.

## 7. Relations entre statut clinique des béliers (score clinique) et excrétion de *B. ovis* dans le sperme (cultures et PCR)

Le graphe n°11 et le tableau n°41 présentent la relation entre le statut clinique des béliers (score clinique) et les cultures.



Graphe n°11 : relation entre statut clinique des béliers (score clinique) et cultures

Tableau n°41 : relation entre statut clinique des béliers (score clinique) et cultures, en pourcentage par catégories de score clinique

| Pourcentages (catégories de score clinique) | Cultures positives | Cultures négatives | Total |
|---|--------------------|--------------------|-------|
| Mauvais                                     | <b>70,4%</b>       | 29,6%              | 100%  |
| Moyens                                      | 46,9%              | 53,1%              | 100%  |
| Bons  | 34,1%              | <b>65,9%</b>       | 100%  |

Il semble que les béliers ayant un score clinique « mauvais » obtiennent plutôt un résultat positif en cultures : 70,4% des béliers « mauvais » ont en effet des cultures positives. Réciproquement, il semble que les béliers ayant un score clinique « bon » obtiennent plutôt un résultat négatif en cultures : 65,9% d'entre eux ont en effet des cultures négatives. L'interprétation est moins évidente pour les béliers classés « moyens » qui obtiennent aussi bien des cultures positives que négatives (46,9-53,1%).

Les résultats de l'analyse statistique relative à l'étude de la relation entre score clinique et cultures sont présentés au tableau n°42.

Tableau n°42 : statistiques relatives à l'étude de la relation entre score clinique et cultures

| Éléments comparés                 | Test exact de Fisher |
|-----------------------------------|----------------------|
| <b>Score clinique et cultures</b> | <b>p = 0,004214</b>  |
| Age et cultures                   | p = 0,448            |
| NEC et cultures                   | <b>p = 0,02647</b>   |
| CS et cultures                    | p = 0,3648           |
| <b>Lésions et cultures</b>        | <b>p = 3,859e-08</b> |

L'analyse statistique montre l'existence d'une relation significative entre le score clinique et les cultures ( $p < 0,05$ ). **Les béliers ayant un score clinique « mauvais » excrètent significativement plus la bactérie que les autres.**

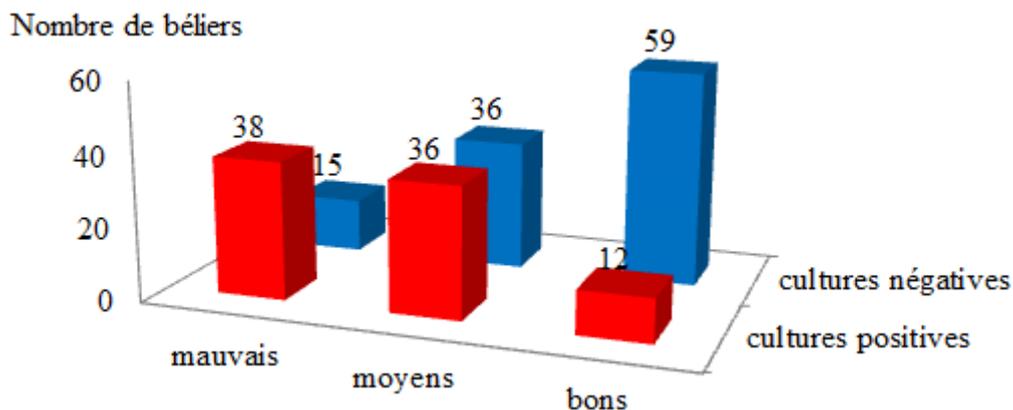
En rentrant plus dans le détail, l'analyse statistique ne montre pas de relation significative entre les cultures et les paramètres « âge » et « CS ». Il existe en revanche des relations significatives entre les paramètres « NEC » et « lésions de l'appareil génital » et les cultures ( $p < 0,05$ ). **Les béliers porteurs de lésions de l'appareil génital présentent donc un risque significativement plus élevé d'excrétion de *B. ovis*. De même, les béliers en mauvais état d'entretien excrètent significativement plus la bactérie que les autres.**

En annexe N°IV sont présentés les graphes décrivant les relations entre les quatre paramètres cliniques (âge, NEC, CS et lésions de l'appareil génital) et les cultures.

Les relations entre le statut clinique des béliers (score clinique, âge, NEC, CS et lésions de l'appareil génital) et les PCR sont présentées en annexe N°V.

### 8. Relations entre statut séminologique des béliers (score séminologique) et excrétion de *B. ovis* dans le sperme (cultures et PCR)

Le graphe n°12 et le tableau n°43 présentent la relation entre le statut séminologique des béliers (score séminologique) et les cultures.



Graphique n°12 : relation entre qualité de la semence (score séminologique) et cultures

Tableau n°43 : relation entre qualité de la semence (score séminologique) et cultures, en pourcentage par catégories de score séminologique

| Pourcentages (catégories de score séminologique) | Cultures positives | Cultures négatives | Total |
|--|--------------------|--------------------|-------|
| Mauvais  | <b>71,7%</b>       | 28,3%              | 100%  |
| Moyens   | 50,0%              | 50,0%              | 100%  |
| Bons   | 16,9%              | <b>83,1%</b>       | 100%  |

Il semble que les béliers ayant un score séminologique « mauvais » obtiennent plus fréquemment un résultat positif en cultures : 71,7% des béliers « mauvais » ont en effet des cultures positives. Réciproquement, il semble que les béliers ayant un score séminologique « bon » obtiennent plus fréquemment un résultat négatif en cultures : 83,1% d'entre eux ont en effet des cultures négatives. L'interprétation est moins évidente pour les béliers classés « moyens » qui obtiennent aussi bien des cultures positives que négatives (50%-50%).

Les résultats de l'analyse statistique relative à l'étude de la relation entre score séminologique et cultures sont présentés au tableau n°44.

Tableau n°44 : statistiques relatives à l'étude de la relation entre score séminologique et cultures

| Eléments comparés  | Test exact de Fisher |
|--|----------------------|
| <b>Score séminologique et cultures</b>                     | <b>p = 1,321e-09</b> |
| <b>Motilité individuelle et cultures</b>                   | <b>p = 1,683e-09</b> |
| <b>Quantité de spermatozoïdes par éjaculat et cultures</b> | <b>p = 2,112e-05</b> |
| <b>Anomalies des spermatozoïdes et cultures</b>            | <b>p = 4,692e-05</b> |

L'analyse statistique montre qu'il existe une relation significative entre score séminologique et cultures ( $p < 0,05$ ). **Les béliers excréteurs présentent donc une qualité de semence détériorée. Les paramètres « motilité individuelle », « quantité de spermatozoïdes par éjaculat » et « anomalies des spermatozoïdes » sont significatifs ( $p < 0,05$ ).**

En annexe N°VI sont présentés les graphes relatifs aux relations entre les trois paramètres séminologiques (motilité individuelle, quantité de spermatozoïdes de l'éjaculat et anomalies des spermatozoïdes) et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme (cultures).

Les relations entre le statut séminologique des béliers (score séminologique, motilité individuelle, quantité de spermatozoïdes de l'éjaculat et anomalies des spermatozoïdes) et les PCR sont présentées en annexe N°VII.

## VI. Discussion

### 1. Discussion du Matériel et Méthode

#### 1.1. Biais

##### *1.1.1. Biais liés au choix des élevages et des béliers*

Les éleveurs participaient à l'étude sur la base du volontariat et choisissaient eux-mêmes les béliers à examiner et prélever. Cette façon de procéder introduit inévitablement un biais d'échantillonnage. En effet, nous ne disposons d'aucune garantie de la représentativité des lots de béliers choisis par chaque éleveur. De plus, nous avons constaté *a posteriori* que l'ensemble des béliers provenait de troupeaux infectés.

Cependant, organiser un tirage au sort des élevages et des béliers aurait été trop contraignant et aurait constitué un obstacle majeur à la réalisation du projet. Nous avons tenu compte de ce biais en limitant la généralisation des conclusions de notre étude.

##### *1.1.2. Biais liés à l'examen d'un nombre élevé de béliers*

- Intervention de nombreux opérateurs

Afin de réaliser l'examen des 218 béliers pendant le temps imparti (*i.e.* 5 jours), plusieurs opérateurs sont intervenus pour la réalisation de certaines étapes du protocole, notamment, l'estimation des NEC, l'examen microscopique de la semence (estimation de la motilité individuelle) et la lecture des lames colorées (estimation du pourcentage de spermatozoïdes anormaux). De ce fait, se pose la question d'un « **effet opérateur** ». Il est probable qu'il existe des différences entre les opérateurs car ces étapes comportent une part d'appréciation personnelle (« **effet inter-opérateur** »). D'autre part, les données fournies par un même opérateur sont susceptibles d'évoluer au cours du temps (« **effet intra-opérateur** »).

Ces deux effets, inter et intra-opérateur, sont difficiles à démontrer statistiquement. En effet, les opérateurs n'ont pas travaillé sur les mêmes béliers, ni sur les mêmes lames colorées, ce qui peut suffire à expliquer d'éventuelles différences. Afin d'évaluer rigoureusement ces effets, il aurait été nécessaire de faire des tests : pour l'effet inter-opérateur, un même lot de béliers et de lames colorées auraient pu être évalué par les différents opérateurs ; pour l'effet intra-opérateur, les examens des mêmes animaux et des mêmes lames auraient pu être répétés à plusieurs reprises et à des moments différents par un même opérateur. Ces tests n'ont pas été réalisés, faute de temps.

- Report dans le temps de certaines étapes

Certaines étapes du protocole ont dû être différées. C'est le cas par exemple de la lecture des lames colorées qui aurait nécessité la présence d'une personne supplémentaire pour se consacrer à cette tâche. Faute de temps et de personnel, cette étape a été effectuée dans les semaines qui ont suivi la manipulation, du 17 septembre au 5 octobre 2012. Au cours du temps, une dégradation de la coloration éosine-nigrosine a été observée et la qualité des lames ne permettait plus d'évaluer le pourcentage de spermatozoïdes morts ou vivants.

### 1.1.3. Biais liés aux techniques

- Electro-éjaculation

Les béliers répondent de manière différente à l'électro-éjaculation. Un nombre de stimulations électriques variable était nécessaire selon les animaux afin d'obtenir une réponse. Ainsi, la question peut se poser de savoir si les béliers azoospermiques (n = 7) étaient effectivement stériles ou s'il s'agit d'animaux n'ayant pas répondu aux stimulations.

Chez le taureau, il est rapporté que l'électro-éjaculation peut entraîner des modifications de volume et de densité de l'éjaculat (BARTH, 2007). Pour tenir compte de cet effet dilution de la semence, nous avons privilégié le paramètre « quantité de spermatozoïde de l'éjaculat » par rapport au paramètre « concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat » pour la détermination du score séminologique (*cf.* paragraphe IV.5.2.1.).

- Coloration à l'éosine nigrosine

La coloration à l'éosine-nigrosine des lames entraîne des artefacts, en particulier la présence de flagelles repliés (RON SIN, communication personnelle). Afin de limiter les répercussions sur l'évaluation de la qualité de la semence, les flagelles repliés n'ont pas été pris en compte dans l'estimation du pourcentage de spermatozoïdes anormaux.

## 1.2. Seuils

### 1.2.1. Choix des seuils pour les méthodes sérologiques

Les seuils choisis pour les méthodes sérologiques sont ceux utilisés en routine sur le terrain. Ces seuils auraient pu être modifiés en tenant compte de la prévalence de l'épididymite contagieuse en région PACA (53% des élevages infectés en 2011), des objectifs (détecter un maximum de béliers infectés) et des contraintes économiques. En effet, d'après PRAUD *et al.* (2012), le choix des seuils utilisés pour les méthodes sérologiques dépend de la prévalence et des objectifs. En milieu sain, le choix d'un seuil de positivité élevé permet de limiter le risque de « faux positifs ». En milieu infecté, comme c'est le cas pour cette étude, le choix d'un seuil de positivité bas permet de limiter le nombre de « faux négatifs ».

### 1.2.2. Choix des seuils pour les paramètres cliniques et séminologiques

Le choix des seuils utilisés pour classer les béliers dans les catégories « bons », « moyens » ou « mauvais » par rapport au paramètre clinique ou séminologique considéré (*cf.* paragraphe IV.5.) s'est inspiré des travaux de VAN METRE *et al.* (2012) et de ceux de KIMBERLING and PARSONS (2007), dont les seuils sont présentés aux tableaux n°45 et n°46.

Tableau n°45 : seuils utilisés par VAN METRE *et al.* (2012)

| Paramètres  |           | « insuffisant » | « moyen » | « satisfaisant » | « excellent » |
|---|-----------|-----------------|-----------|------------------|---------------|
| Etat d'entretien  |           | 1 et 5          | /         | 2 et 4           | 3             |
| CS (cm)   | 6-13 mois | < 26            | 27-29     | 30-35            | ≥ 36          |
|   | ≥ 14 mois | < 29            | 30-32     | 33-39            | ≥ 40          |
| Lésions   |           | Présentes       | Absentes  | Absentes         | Absentes      |
| Motilité (%)  |           | 0%              | 10-30%    | 31-69%           | 70-100%       |
| Anomalies des spermatozoïdes (pourcentages de spermatozoïdes normaux) |           | ≤ 29%           | 30-50%    | 51-79%           | ≥ 80%         |

Tableau n°46 : seuils utilisés par KIMBERLING and PARSONS (2007)

| Paramètres   |            | « insuffisant » | « moyen » | « satisfaisant » | « excellent » |
|--|------------|-----------------|-----------|------------------|---------------|
| CS (cm)  | 6-12 mois  | < 30            | < 30      | > 30             | > 33          |
|  | 12-18 mois | < 33            | < 33      | > 33             | > 35          |
| Motilité (%)   |            | < 30%           | < 30%     | > 30%            | > 50%         |
| Anomalies des spermatozoïdes<br>(Pourcentages de spermatozoïdes normaux) |            | < 50%           | < 70%     | > 70%            | > 90%         |

Pour l'état d'entretien, au cours de notre étude, la NEC 5 n'a été attribuée à aucun bélier. La seule différence avec notre classement est donc que les béliers ayant obtenu la NEC 2 ont été considérés comme « bons » et non comme « satisfaisants » d'après VAN METRE *et al.* (2012).

Pour la CS, tous les béliers participant à l'étude étant âgés de 1 an ou plus, nous nous sommes intéressés aux seuils proposés pour les béliers âgés de plus de 12 mois. La catégorie « mauvais » correspond au regroupement des catégories « insuffisant » et « moyen » de VAN METRE *et al.* (2012) et de KIMBERLING and PARSONS (2007). Pour les catégories « moyen » et « bon », nous avons choisi le seuil de VAN METRE *et al.* (2012), à savoir 39 cm, pour séparer les béliers « moyens » des béliers « bons », car plus discriminant que le seuil retenu par KIMBERLING and PARSONS (2007), à savoir 35 cm.

Pour les lésions de l'appareil génital, le principe que nous avons utilisé est le même que celui de VAN METRE *et al.* (2012) mais nous avons été plus sévères en ne distinguant que deux catégories « bon » *versus* « mauvais ».

Pour la motilité individuelle, la catégorie « mauvais » correspond au regroupement des catégories « insuffisant » et « moyen » de VAN METRE *et al.* (2012) et de KIMBERLING and PARSONS (2007). Pour les catégories « moyen » et « bon », nous avons choisi le seuil de VAN METRE *et al.* (2012), à savoir 70%, pour séparer les béliers « moyens » des béliers « bons », car plus discriminant que le seuil retenu par KIMBERLING and PARSONS (2007), à savoir 50%.

Pour les anomalies des spermatozoïdes, notre classement correspond à celui de KIMBERLING and PARSONS (2007) en regroupant les catégories « satisfaisant » et « excellent » dans la catégorie « bons ».

Enfin, pour la quantité des spermatozoïdes par éjaculat, le choix des seuils s'est inspiré des recommandations de WATSON (1990). Ces recommandations concernent le volume et la concentration en spermatozoïdes des éjaculats de béliers et sont présentés au tableau n°47.

Tableau n°47 : valeurs usuelles relatives au volume et à la concentration des éjaculats de béliers d'après WATSON (1990)

|                              | Valeurs usuelles |
|------------------------------|------------------|
| Volume (mL)                  | 1-2              |
| Concentration (milliards/mL) | 2-4,5            |

Dans l'ensemble, les seuils qui ont été retenus pour cette étude sont ceux qui permettent de distinguer le plus nettement possible les béliers « bons » des béliers « mauvais ». D'autre part, avec ces seuils, chaque catégorie comprend un nombre suffisant d'animaux.

### 1.2.3. Choix des seuils pour l'analyse statistique

Pour l'analyse statistique, il était nécessaire que toutes les catégories comportent un nombre suffisant d'animaux. Quelle que soit la méthode diagnostique, la catégorie « douteux » comportait peu d'animaux (22 béliers « FC douteux » ; 11 béliers « ELISA douteux » et 7 béliers « PCR douteux ») et posait donc problème.

Delors, plusieurs possibilités étaient envisageables pour ces béliers « douteux » : les regrouper avec les béliers « positifs », les regrouper avec les béliers « négatifs » ou encore les répartir entre les deux catégories.

Nous avons choisi de regrouper les béliers « FC douteux » avec les béliers « FC négatifs ». De même, les béliers « PCR douteux » ont été regroupés avec les béliers « PCR négatifs ». Les béliers « ELISA douteux » ont été répartis dans les catégories « ELISA positifs » et « ELISA négatifs » selon le seuil de 45% de DO.

## 2. Discussion des résultats : interprétation et données de la littérature

### 2.1. Résultats des analyses sérologiques

Les résultats des sérologies obtenus sont en accord avec les données de la littérature qui décrivent l'I-ELISA comme plus sensible que la FC (PRAUD *et al.*, 2012). En effet, nous obtenons un taux de positivité supérieur en I-ELISA par rapport à celui obtenu en FC (51,4% de positivité en I-ELISA contre 37,2% de positivité en FC).

La comparaison des résultats des tests I-ELISA des béliers sur plusieurs mois ou années consécutifs (*cf.* paragraphes V.3.4. et V.4.3.) a montré que certains animaux séronégatifs lors du premier test I-ELISA deviennent séropositifs lors du second (23 béliers concernés). Il peut s'agir d'animaux récemment infectés par *B. ovis*.

Inversement, nous avons aussi remarqué quelques animaux séropositifs lors du premier test I-ELISA et séronégatifs lors du test I-ELISA suivant (seulement 4 béliers concernés). L'hypothèse d'une guérison est peu probable, les béliers infectés le restant généralement pendant plusieurs années (RIDLER and WEST, 2011). Ces animaux doivent être considérés comme des « faux négatifs ».

### 2.2. Résultats des cultures et des PCR

Les travaux de MANTEROLA *et al.* (2003) et ceux de XAVIER *et al.* (2010) avaient pour objectif de comparer la sensibilité et la spécificité de la PCR à celle des cultures. En prenant pour base les résultats des sérologies, les deux études obtiennent des sensibilités équivalentes pour les PCR et les cultures (*cf.* tableau n°48).

Tableau n°48 : résultats des études de MANTEROLA *et al.* (2003) et XAVIER *et al.* (2010)

|                                | Sensibilité PCR | Sensibilité cultures |
|--------------------------------|-----------------|----------------------|
| MANTEROLA <i>et al.</i> (2003) | 51,9%           | 50%                  |
| XAVIER <i>et al.</i> (2010)    | 70%             | 69,6%                |

Dans notre étude, un taux de 55,6% de positivité a été obtenu pour les cultures et les résultats des PCR ont révélé un taux de positivité de 93,6%, très élevé, dont l'interprétation est délicate.

La PCR permet la détection de bactéries mortes, ce qui n'est pas le cas des cultures, car seules les bactéries vivantes sont capables de se multiplier et de former des colonies. Cependant, la présence de bactéries mortes paraît insuffisante pour expliquer les différences observées dans notre étude.

Rappelons que la PCR est une technique extrêmement sensible. Des réactions faussement positives peuvent survenir lors de problèmes liés au laboratoire (contaminations croisées). Les principales erreurs proviennent soit d'un transfert de produit à partir d'un échantillon positif soit, et c'est le cas le plus fréquent, à partir de produits issus d'expériences précédentes (OIE, 2008a).

L'hypothèse d'une contamination du sperme par le biais des cônes de prélèvement (défaut de désinfection) peut aussi être évoquée mais semble peu probable, dans la mesure où les résultats négatifs ont été obtenus tout au long de la semaine.

Dans ce contexte, la fiabilité de nos résultats PCR peut légitimement être remise en question et il est préférable de ne pas en tenir compte pour d'éventuelles comparaisons avec d'autres études.

### 2.3. Relations entre statut sérologique et excrétion de *B. ovis* dans le sperme

Les travaux de FICAPAL *et al.* (1998) rapportent qu'il existe une relation significative entre séropositivité et excrétion de *B. ovis* dans le sperme. C'est aussi le cas pour notre étude (*cf.* paragraphe V.6.). Ces travaux indiquent également que le nombre de béliers séropositifs est significativement plus élevé que celui de béliers excréteurs, ce qui est en accord avec le fait que l'excrétion de *B. ovis* est intermittente dans le sperme.

Dans notre étude, des béliers avec des sérologies positives et des cultures négatives ont été remarqués. Sont concernés 13 béliers séropositifs en FC (« FC positifs ») et 23 béliers séropositifs en I-ELISA (« ELISA positifs ») (*cf.* paragraphes V.6.1. et V.6.2.). Cette observation peut être expliquée par l'excrétion intermittente de *B. ovis* dans le sperme.

### 2.4. Relations entre statut clinique et excrétion de *B. ovis* dans le sperme

Les travaux de KOTT *et al.*, portant sur 154 béliers, ont montré que ni l'âge, ni la NEC n'avaient d'influence sur le résultat des cultures ( $p > 0,05$ ). Les lésions de l'appareil génital n'ont pas été étudiées car aucun bélier ne présentait de lésions de l'appareil génital.

D'après les conclusions de l'étude de FICAPAL *et al.* (1998), portant sur 110 béliers, les animaux ayant des cultures positives présentent plus de lésions de l'appareil génital que les autres. Une autre conclusion de FICAPAL *et al.* est que l'âge n'a pas d'influence sur l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme, même si la prévalence de l'infection est plus faible chez les jeunes béliers (< 2 ans) et chez les béliers âgés (> 5 ans).

Nos conclusions sont les mêmes que celles de KOTT *et al.* et FICAPAL *et al.* pour l'âge ( $p > 0,05$ , *cf.* paragraphe V.7.). Nous retrouvons aussi les résultats de FICAPAL *et al.* en ce qui concerne les lésions de l'appareil génital ( $p < 0,05$ , *cf.* paragraphe V.7.). En revanche, nos conclusions diffèrent de celles de KOTT *et al.* pour la NEC. En effet, nos résultats vont dans le sens d'une influence de la NEC sur l'excrétion de *B. ovis* ( $p < 0,05$ , *cf.* paragraphe V.7.).

## 2.5. Relations entre statut séminologique et excrétion de *B. ovis* dans le sperme

KOTT *et al.* se sont également intéressés à la qualité de la semence. Leur étude a démontré que la qualité du sperme est détériorée chez les béliers ayant des cultures positives : ces animaux présentent en effet une motilité individuelle plus faible ( $p < 0,05$ ), un pourcentage de spermatozoïdes anormaux plus élevé ( $p < 0,05$ ) et un pourcentage de spermatozoïdes vivants plus faible ( $p < 0,05$ ). Les anomalies des spermatozoïdes rencontrées le plus fréquemment chez les béliers excréteurs concernent la tête des spermatozoïdes ( $p < 0,01$ ).

Les résultats de notre étude vont dans le même sens. En effet, nous trouvons aussi des relations significatives entre la motilité individuelle ( $p < 0,01$ ) et les anomalies des spermatozoïdes ( $p < 0,01$ ) et les résultats des cultures (*cf.* paragraphe V.8.). Les anomalies concernant la tête des spermatozoïdes (tête seules) sont celles qui ont été les plus fréquemment observées sur nos lames colorées (*cf.* tableau n°29, paragraphe V.2.3.).

CARVALHO JUNIOR *et al.* ont étudié 9 béliers infectés expérimentalement par *B. ovis*. Des changements de morphologie des spermatozoïdes ont été mis en évidence : une augmentation du nombre de flagelles enroulés a en effet été constatée. Les autres anomalies des spermatozoïdes n'ont pas significativement varié chez ces animaux. Ces béliers infectés expérimentalement présentaient aussi des cellules inflammatoires et des neutrophiles dans leur semence. Ces résultats confirment une détérioration de la qualité de la semence chez les béliers séropositifs, également démontrée dans notre étude.

En accord avec les données de la littérature, les principaux résultats à retenir sont l'existence d'une corrélation entre séropositivité et excrétion de *B. ovis* dans le sperme (KOTT *et al.*, 1988 ; FICAPAL *et al.*, 1998), une augmentation de la présence de lésions de l'appareil génital chez les béliers excréteurs (FICAPAL *et al.*, 1998) et une détérioration de la qualité de la semence chez les béliers excréteurs (CARVALHO JUNIOR *et al.*, 2012 ; KOTT *et al.*, 1988).

## 3. Proposition d'un plan de réforme des béliers

La récolte et l'analyse de la semence n'étant pas réalisables en routine, la bactériologie sur sperme ne peut pas être envisagée comme un critère utilisable pour la mise en place d'un plan de lutte à grande échelle.

La sérologie est un critère plus adapté, d'autant plus que sérologie et excrétion de *B. ovis* dans le sperme sont bien corrélées. Les tests I-ELISA peuvent être privilégiés car plus sensibles que la FC. La clinique est également fondamentale, puisqu'il existe une bonne corrélation entre la présence de lésions et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme.

Selon la prévalence de l'épididymite contagieuse, la conduite à tenir suivante peut être proposée aux éleveurs, en accord avec les propositions de PICARD-HAGEN *et al.* (2013).

### 3.1. Département à faible prévalence

Dans un département à faible prévalence, l'objectif est de détecter tous les béliers infectés et de les réformer et ainsi, éradiquer la maladie.

La conduite à tenir proposée est présentée sur le schéma n°1.

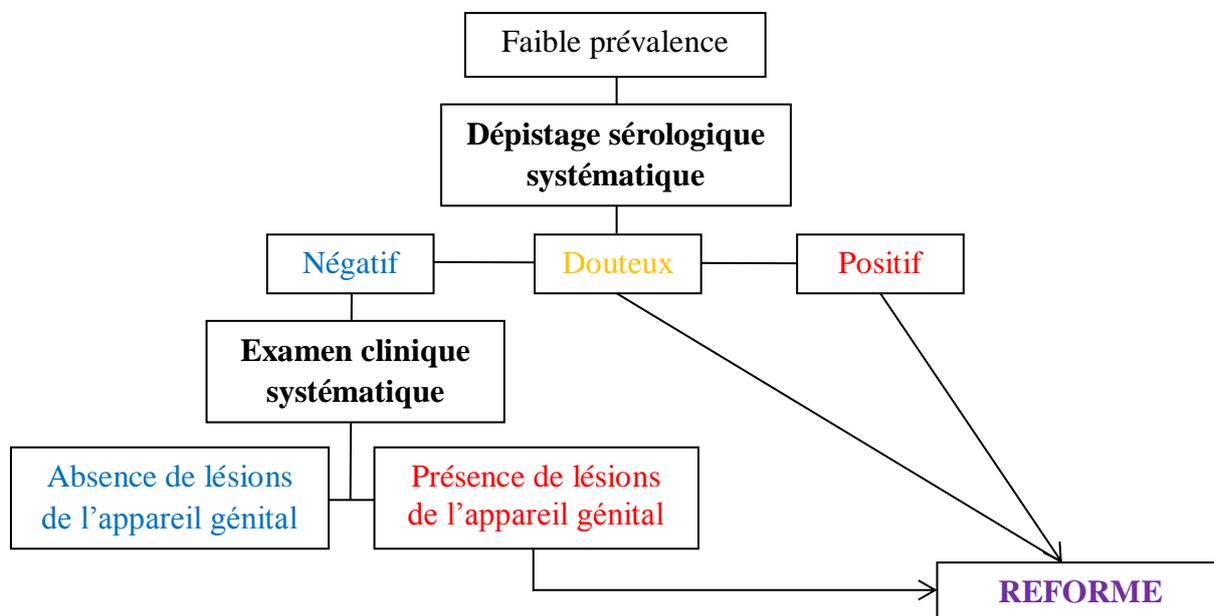


Schéma n°1 : arbre de décision utilisable dans les zones de faible prévalence

Le dépistage sérologique systématique de tous les béliers par la méthode I-ELISA pourrait être suivi de l'élimination des béliers séropositifs ou douteux. Le choix d'un seuil de positivité bas pourrait être retenu, afin d'être certain de détecter tous les béliers infectés, quitte à condamner quelques béliers « faux positifs ». La réforme des béliers séronégatifs pour lesquels des lésions de l'appareil génital sont décelées à l'examen clinique est également recommandée.

### 3.2. Département à forte prévalence

Dans un département à forte prévalence, la démarche proposée précédemment n'est pas applicable car elle conduirait à la réforme d'un nombre trop important de béliers, dommageable au plan économique et génétique.

Suite au dépistage sérologique systématique de tous les béliers, les béliers fortement séropositifs pourraient être réformés en priorité. La réforme des béliers pour lesquels des lésions de l'appareil génital sont décelées à l'examen clinique est également recommandée. Il est évident que cette seule stratégie n'est pas suffisante pour éliminer la totalité des béliers excréteurs, les béliers douteux, faiblement et moyennement séropositifs et ne présentant pas de lésions de l'appareil génital, restant dans le troupeau et étant susceptibles d'excréter la bactérie. Afin d'éviter la contamination des animaux sains, il serait judicieux de ne pas mélanger ces béliers avec le reste du troupeau et de les utiliser par la saillie de lots de brebis différents. A long terme, ces béliers sont porteurs de *B. ovis* et susceptibles d'être excréteurs pendant plusieurs années. Ils devraient donc être progressivement réformés et remplacés par des béliers sains.

La conduite à tenir proposée est présentée sur le schéma n°2.

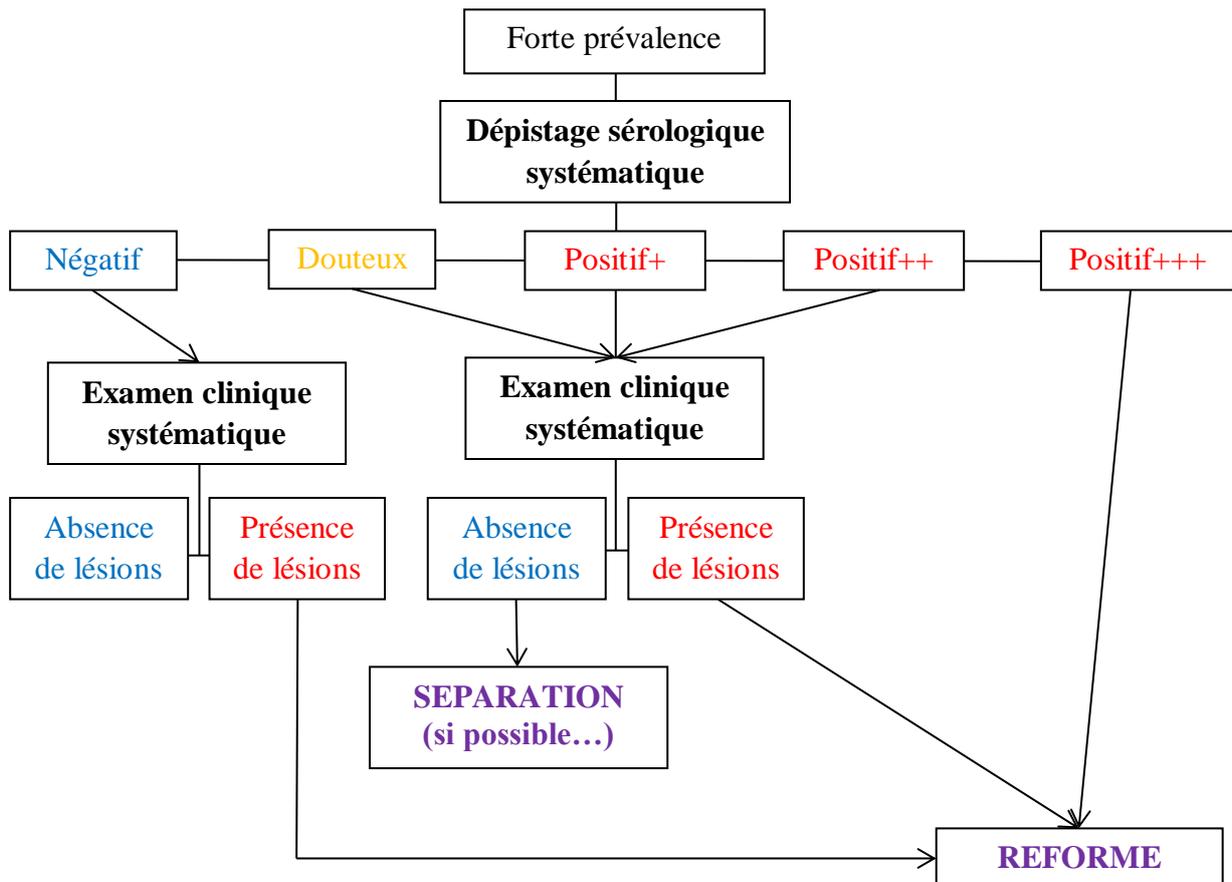


Schéma n°2 : arbre de décision utilisable dans les zones de forte prévalence

D'autre part, à l'image de ce qui est pratiqué depuis 2012 dans les Pyrénées Atlantiques, où 24% des troupeaux étaient infectés en 2011, la vaccination des jeunes béliers âgés de 3 à 6 mois et destinés à la monte naturelle pourrait être envisagée dans ces départements. Cette vaccination, à l'aide du vaccin REV 1, permettrait la protection des jeunes mâles sans perturber le dépistage sérologique de l'épididymite contagieuse. En effet, les anticorps post-vaccinaux disparaissent en moins de 4 mois et il n'y a pas, ou très peu, de réaction croisée entre *B. ovis* et *B. melitensis*. L'inconvénient majeur de cette vaccination est qu'elle entraînerait, pour les troupeaux vaccinés, la perte du statut « officiellement indemne de Brucellose » avec des conséquences en termes de mouvements d'animaux (ventes de reproducteurs, transhumance) essentiellement.

Séparer les béliers potentiellement excréteurs des béliers sains se heurte à certaines pratiques d'élevage, dont la transhumance et le mélange de troupeaux en estive. Afin d'en tenir compte, il faut envisager de n'autoriser l'accès à certains pâturages collectifs qu'aux troupeaux sains (entièrement et régulièrement séronégatifs) ou pratiquant la vaccination (associée à l'élimination progressive des mâles âgés séropositifs et/ou présentant des lésions) ou, à l'inverse, de réserver certaines estives aux troupeaux infectés.

#### 4. Perspectives

Manipuler 218 béliers sur une semaine nécessite une organisation efficace, en amont et au moment d'effectuer les prélèvements, ce qui était le cas pour cette étude. Quelques améliorations peuvent néanmoins être proposées.

Tout d'abord, malgré les contraintes, il serait intéressant de choisir les élevages et les béliers aléatoirement. Cela permettrait d'obtenir un échantillon représentatif de la situation en région PACA, ou plus particulièrement dans les Bouches-du-Rhône. Des élevages sains devraient être inclus dans l'étude et fournir ainsi des béliers témoins qui permettraient de vérifier la fiabilité des méthodes de diagnostic utilisées. Inclure dans l'étude des béliers infectés expérimentalement paraît plus compliqué à mettre en place et d'un intérêt moindre, vus les objectifs du projet.

Au moment des manipulations des béliers, il faut prévoir un nombre suffisant de personnes pour assurer le bon déroulement de chaque étape du protocole. C'était, dans l'ensemble, le cas pour cette étude mais la présence d'une ou deux personnes supplémentaires, capables de lire au fur et à mesure les lames colorées, aurait été appréciable et aurait permis d'être capable d'estimer les pourcentages de spermatozoïdes morts et vivants. Dans le cas où ce ne serait pas possible, luter les lames colorées afin d'augmenter leur durée de vie et permettre une lecture différée de meilleure qualité, peut être proposé.

D'autre part, il serait judicieux d'attribuer certaines étapes toujours à la même personne afin de s'affranchir du biais « opérateur ». C'est particulièrement important pour certaines étapes qui nécessitent une part d'appréciation personnelle, comme l'estimation de la NEC, celle de la motilité individuelle ou encore celle du pourcentage de spermatozoïdes normaux. Une autre façon de s'affranchir de ce problème serait d'utiliser des systèmes automatisés, à l'image du spectrophotomètre qui permet d'obtenir une valeur normalisée de la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat. Peser les béliers au lieu d'estimer leur NEC pourrait être envisagé. De même, utiliser un système automatisé de type CASA (IMV technologies, L'Aigle, France) pour la lecture des lames serait intéressant et permettrait de s'affranchir des biais liés à la lecture différée des lames, par des opérateurs différents. L'inconvénient de ces appareils reste leur coût.

Lors de la lecture des lames, répertorier précisément les cellules autres que des spermatozoïdes (leucocytes) permettrait d'affiner encore les données. En effet, les travaux de VAN METRE *et al.* rapportent qu'une leucospermie est un des premiers signes observé chez les béliers expérimentalement infectés par *B. ovis*. Une leucospermie peut aussi être observée en cas de contamination par des sécrétions préputiales qui peuvent avoir lieu au moment de la collecte de la semence. Extérioriser manuellement le pénis permet de minimiser ce risque (VAN METRE *et al.*, 2012).

Enfin, il faut également prévoir suffisamment de temps à consacrer à chaque animal afin que chaque étape puisse être réalisée rigoureusement. La description des lésions aurait pu être plus précise si plus de temps avait pu être consacré à l'examen clinique et si nécessaire échographique, de chaque bélier.

## **VII. Conclusion**

Nous avons étudié les relations entre le statut sérologique des béliers et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme sur un échantillon de 218 béliers, en région PACA.

Des relations significatives entre le statut clinique, séminologique et sérologique des béliers et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme ont été démontrées : **la majorité des béliers excréteurs sont séropositifs en FC et en I-ELISA, présentent des lésions de l'appareil génital et ont une semence de mauvaise qualité.** Cependant, étant donné les biais importants de notre protocole, ces résultats ne peuvent être généralisés. Ils permettent néanmoins d'apporter des bases pour proposer aux éleveurs un plan adapté de réforme des béliers en région PACA. La réforme des béliers sur la base de leur clinique (présence de lésions de l'appareil génital) et de leur statut sérologique est recommandée. Afin de tenir compte du contexte économique et des pratiques d'élevage, la vaccination des jeunes béliers de moins de 6 mois et une réglementation des transhumances selon le statut des troupeaux vis-à-vis de *B. ovis* pourrait être envisagée.

Au cours de cette étude, les occasions de communiquer avec les éleveurs ont été nombreuses. Les échanges ont eu lieu pendant la semaine de manipulation des béliers mais aussi à l'occasion de présentations orales (présentation des premiers résultats à la Journée Bovine Toulousaine (JBT) à l'ENVT le 18 octobre 2012, restitution des résultats aux éleveurs à Aix en Provence le 11 avril 2013, présentation des résultats aux Journées Nationales de la Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires (SNGTV) à Nantes les 15, 16 et 17 mai 2013) et de publications scientifiques (PICARD-HAGEN *et al.* en cours de rédaction et deux thèses de doctorat vétérinaire).

Nous espérons que l'ensemble de ce travail aura contribué à sensibiliser les éleveurs et l'ensemble des acteurs de la filière ovine en région PACA sur l'impact économique et sanitaire de l'épididymite contagieuse et plus généralement, sur l'importance du mâle reproducteur dans le troupeau. Malheureusement, les éleveurs semblent préférer augmenter le nombre de béliers par troupeau, ce qui est moins contraignant qu'une réforme et un renouvellement raisonné des animaux et paraît équivalent sur le plan économique. L'effort de communication devra donc être poursuivi à l'avenir.

## VIII. Bibliographie

BARTH A.D. (2007). Evaluation of Potentiel Breeding Soundness of the Bull. In *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2<sup>nd</sup> edition. Saint-Louis, Missouri: Saunders, p. 228-235.

BLASCO J.M. (1990). *Brucella ovis*. In *Animal Brucellosis*. Boca Raton, USA: CRC press, p. 351-378.

CARVALHO JUNIOR C.A., MOUSTACAS V.S., XAVIER M.N., COSTA E.A., COSTA L.F., SILVA T.M.A., PAIXAO T.A., GOUVEIA A.M.G., SANTOS R.L. (2012). Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Res.*, **102**, 213-222.

FICAPAL A., JORDANA J., BLASCO J.M., MORIYON I. (1998). Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Ruminant Res.*, **29**, 13-19.

FRANCOIS C. (2008). Epididymite de l'adulte (Epididymite contagieuse du bélier à *Brucella ovis*) [en ligne]. Disponible sur : [http://theses.vet-alfort.fr/Th\\_multimedia/repro\\_ovicap/male/htm/testicules\\_epididymes/epidydimite/epididymite\\_adulte.htm](http://theses.vet-alfort.fr/Th_multimedia/repro_ovicap/male/htm/testicules_epididymes/epidydimite/epididymite_adulte.htm) (consulté en juillet 2013).

KIMBERLING C.V. and PARSONS G.A. (2007). Breeding Soundness Evaluation and Surgical Sterilization of the Ram. In *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Saint-Louis, Missouri: Saunders, p. 620-633.

KOTT R.W., HALVER G.C., FIREHAMMER B., THOMAS V.M. (1988). Relationships between *Brucella ovis* semen culture and various semen and serology parameters. *Theriogenology*, **29(4)**, 961-970.

MANTEROLA L., TEJERO-GARCES A., FICAPAL A., SHOPAYEVA G., BLASCO J.M., MARIN C.M., LOPEZ-GONI I. (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen sample from rams. *Vet. Microbiol.*, **92**, 65-72.

Organisation Mondiale de la Santé animale (OIE) (2008a). Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaine par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses. *Manuel terrestre de l'OIE 2008* [en ligne], **1**, 50-60. Disponible sur : [http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/pdf\\_fr/Volume%201\\_pdf/Chap%201.1.5\\_PCR\\_2008.pdf](http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/pdf_fr/Volume%201_pdf/Chap%201.1.5_PCR_2008.pdf) (consulté en septembre 2013).

Organisation Mondiale de la Santé animale (OIE) (2008b). Les biotechnologies dans le diagnostic des maladies infectieuses et développement des vaccins. *Manuel terrestre de l'OIE 2008* [en ligne], **1**, 72-98. Disponible sur : [http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/pdf\\_fr/Volume%201\\_pdf/Chap%201.1.7\\_Biotech.pdf](http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/pdf_fr/Volume%201_pdf/Chap%201.1.7_Biotech.pdf) (consulté en septembre 2013).

Organisation Mondiale de la Santé animale (OIE) (2009). Ovine Epididymitis (*Brucella ovis*). In *OIE Terrestrial Manual 2009* [en ligne], **2**, 1118-1127. Disponible sur : <http://www.oie.int/fr/normes-internationales/manuel-terrestre/acces-en-ligne/> (consulté en juillet 2013).

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

PICARD-HAGEN N., BERTHELOT X., CHAMPION J.L., CORBOZ N., CORDE Y., DRAPEAU A., EON L., LYAZRHI F., MAROIS M., PEGLION M., SCHUSTER A., TROUCHE C., GARIN-BASTUJI B. (2013). Prévention de l'épididymite contagieuse du bélier à *Brucella ovis* : étude préliminaire des relations entre statut sérologique et fonction sexuelle chez le bélier en région PACA. In : *Prévention : approches opérationnelles. Journées Nationales des GTV*, 15-17 mai 2013, Nantes. SNGTV, 297-301.

PRAUD A., CHAMPION J.L., CORDE Y., DRAPEAU A., MEYER L., GARIN-BASTUJI B. (2012). Assessment of the diagnosis sensitivity and specificity of an indirect I-ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Vet. Res.*, **8**, 68-74. doi:10.1186/1746-6148-8-68.

RIDLER A.L. and WEST D.M. (2011). Control of *Brucella ovis* Infection in Sheep. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, **27**, 61-66.

SAUNDERS V.F., REDDACLIFF L.A., BERG T., HORNITZKY M. (2007). Multiplex PCR for detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Aust. Vet. J.*, **85**, 72-77.

SCOTT P.R. (2001). Health and production management in sheep flocks. In *Herd health: Food Animal Production Medicine*. 3<sup>rd</sup> edition. Philadelphia: WB Saunders Compagny, p. 765-844.

TSOLIS R.M., SECHARDRI R., SANTOS R.L., SANGARI F.J., LOBO J.M., DE JONG M.F., REN Q., PYERS G., BRINKAC L.M., NELSON W.C., DEBOY R.T., ANGIUOLI S., KHOURI H., DIMITROV G., ROBINSON J.R., MULLIGAN S., WALKER R.L., ELZER P.E., HASSAN K.A., PAULSEN I.T. (2009). Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS One*, **4**, 1-9.

VAN METRE D.C., RAO S., KIMBERLING C.V., MORLEY P.S. (2012). Factors associated with failure in breeding soundness examination of Western USA rams. *Prev. Vet. Med.*, **105**, 118-126.

WATSON P.F. (1990). Artificial insemination and the preservation of semen. In *Marshall's physiology of reproduction*. 4<sup>th</sup> edition. Edinburgh, London, Melbourne, New-york: Churchill Livingstone, p.747-769.

XAVIER M.N., SILVA T.M.A, COSTA E.A., PAIXAO T.A., MOUSTACAS V.S., CARVALHO JUNIOR C.A., SANT'ANNA F.M., ROBLES C.A., COUVEIA A.M.G., LAGE A.P., TSOLIS R.M., SANTOS R.L. (2010). Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.*, **145**, 158-164. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.037.

## IX. Annexes

### Annexe N°I : paramètres cliniques et séminologiques moyens en fonction des élevages

Tableau n°49 : paramètres cliniques moyens en fonction des élevages

| Moyenne<br>± écart-type | Age (ans) | NEC              | CS (cm)    | Score<br>clinique |
|-------------------------|-----------|------------------|------------|-------------------|
| Elevage n°1             | 1,8 ± 1,1 | <b>3,8 ± 0,3</b> | 40,1 ± 3,4 | 19,7 ± 1,8        |
| Elevage n°2             | 3,1 ± 1,3 | 2,2 ± 0,5        | 36,0 ± 2,7 | 20,8 ± 4,7        |
| Elevage n°3             | 3,0 ± 1,9 | 2,1 ± 0,6        | 36,8 ± 3,4 | 16,3 ± 5,7        |
| Elevage n°4             | 2,9 ± 2,1 | 2,5 ± 0,5        | 35,9 ± 2,1 | 22,0 ± 4,5        |
| Elevage n°5             | 3,6 ± 1,5 | 2,3 ± 0,5        | 36,3 ± 3,0 | 21,5 ± 5,6        |
| Elevage n°6             | 3,8 ± 2,0 | 2,0 ± 0,4        | 34,9 ± 3,0 | 14,4 ± 6,6        |
| Elevage n°7             | 3,7 ± 1,9 | 2,3 ± 0,5        | 36,4 ± 4,2 | 20,7 ± 5,0        |
| Elevage n°8             | 3,8 ± 1,5 | 2,0 ± 0,3        | 34,0 ± 3,1 | 14,2 ± 5,5        |
| Elevage n°9             | 3,9 ± 1,4 | 2,1 ± 0,4        | 35,1 ± 4,1 | 19,9 ± 5,6        |
| Elevage n°10            | 3,5 ± 1,8 | 2,0 ± 0,4        | 36,6 ± 3,6 | 19,4 ± 3,2        |
| Elevage n°11            | 2,6 ± 0,7 | <b>3,4 ± 0,3</b> | 39,0 ± 3,2 | 23,0 ± 2,6        |

Tableau n°50 : paramètres séminologiques moyens en fonction des élevages

| Moyenne<br>± écart-type | Motilité<br>individuelle (%) | Spermatozoïdes/éjaculat<br>(milliards) | Spermatozoïdes<br>normaux (%) | Score<br>séminologique |
|-------------------------|------------------------------|--|-------------------------------|------------------------|
| Elevage n°1             | 46,8 ± 29,2                  | 1,9 ± 1,5                              | 72,6 ± 17,4                   | 13,9 ± 4,6             |
| Elevage n°2             | 38,3 ± 31,4                  | 1,4 ± 1,2                              | 69,4 ± 21,7                   | 11,4 ± 5,6             |
| Elevage n°3             | 56,4 ± 27,0                  | 2,9 ± 2,5                              | 79,5 ± 17,6                   | 15,6 ± 4,5             |
| Elevage n°4             | 57,4 ± 29,4                  | 1,6 ± 1,8                              | 83,6 ± 21,4                   | 14,4 ± 5,2             |
| Elevage n°5             | 53,3 ± 31,4                  | 2,3 ± 2,0                              | 80,4 ± 17,3                   | 15,2 ± 6,6             |
| Elevage n°6             | 18,1 ± 20,5                  | 1,0 ± 0,9                              | 62,0 ± 21,2                   | 9,0 ± 4,1              |
| Elevage n°7             | 52,7 ± 29,4                  | 1,5 ± 1,2                              | 84,4 ± 20,5                   | 15,0 ± 5,5             |
| Elevage n°8             | 31,3 ± 34,0                  | 0,9 ± 1,6                              | 71,9 ± 21,5                   | 9,8 ± 4,6              |
| Elevage n°9             | 55,2 ± 27,6                  | 2,2 ± 1,9                              | 84,9 ± 20,6                   | 14,8 ± 5,0             |
| Elevage n°10            | 56,3 ± 29,6                  | 2,0 ± 1,5                              | 80,6 ± 27,6                   | 15,0 ± 5,1             |
| Elevage n°11            | 44,1 ± 22,6                  | 1,4 ± 1,3                              | 72,0 ± 26,9                   | 11,5 ± 4,8             |

## **Annexe N°II : motilité massale**

Tableau n°51 : distribution des motilités massales

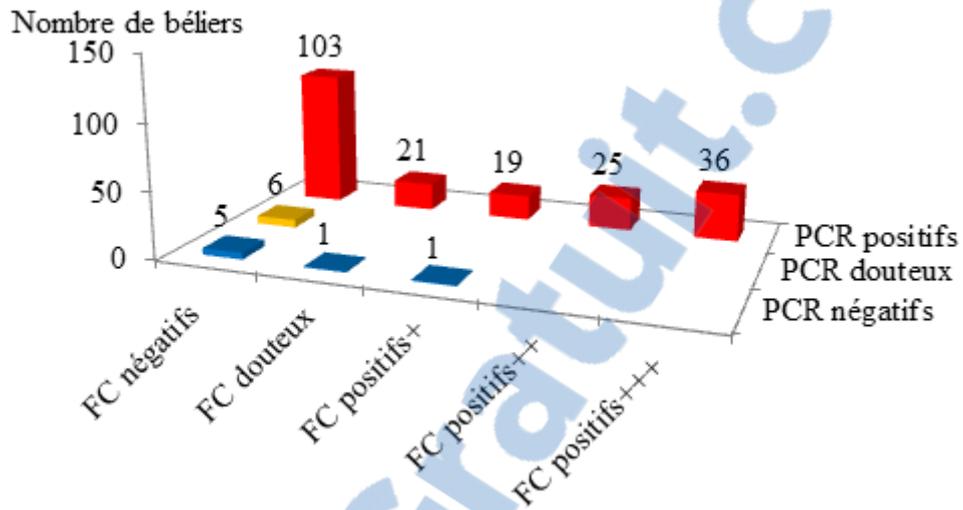
|                  | Moyenne $\pm$ écart-type | Médiane | Minimum | Maximum |
|------------------|--------------------------|---------|---------|---------|
| Motilité massale | 2,51 $\pm$ 1,54          | 3       | 0       | 5       |

Tableau n°52 : répartition des 218 béliers selon leur motilité massale

|                              | Nombre de béliers | Pourcentages |
|------------------------------|-------------------|--------------|
| Note 0                       | 33                | 15,1%        |
| Note 1                       | 29                | 13,3%        |
| Note 2                       | 35                | 16,1%        |
| Note 3                       | 48                | 22,0%        |
| Note 4                       | 58                | 26,6%        |
| Note 5                       | 14                | 6,4%         |
| Motilité massale non mesurée | 1                 | 0,5%         |
| Total                        | 218               | 100%         |

**Annexe N°III : relations entre statut sérologique des béliers (FC et ELISA) et excrétion de *B. ovis* dans le sperme (PCR)**

**1. Relation entre le statut sérologique en FC et les PCR**

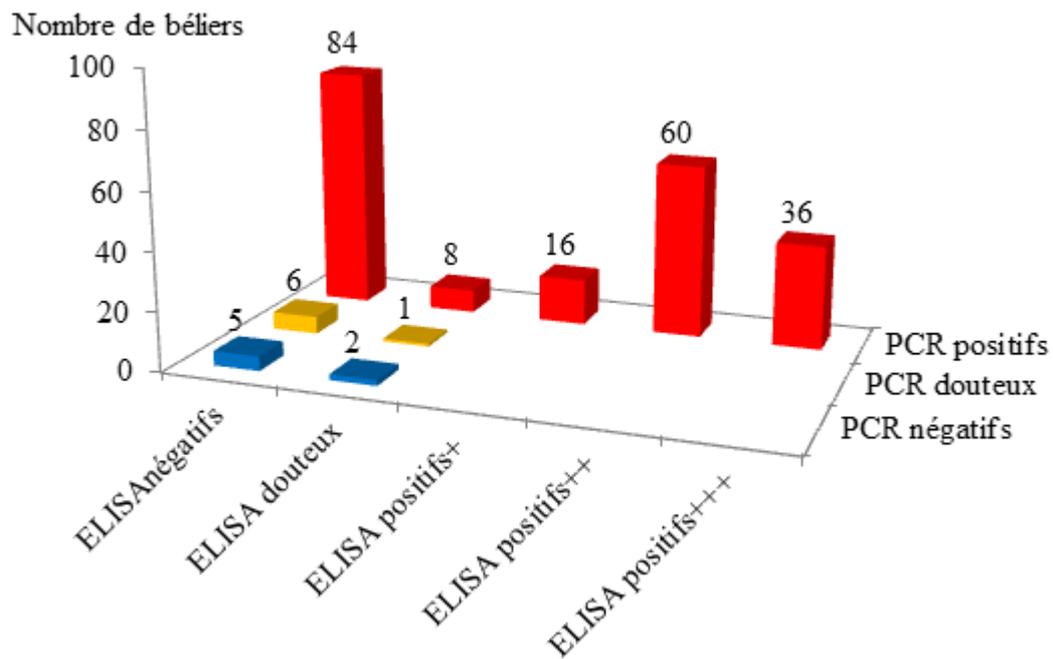


Graphique n°13 : relation entre statut sérologique en FC et PCR

Tableau n°53 : relation entre statut sérologique en FC et PCR, en pourcentage du total par catégories de FC

| Pourcentages (catégories de FC) | PCR négatifs | PCR douteux | PCR positifs | Total |
|---------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------|
| FC négatifs                     | 4,4%         | 5,3%        | 90,4%        | 100%  |
| FC douteux                      | 4,5%         | 0%          | 95,5%        | 100%  |
| FC positifs+                    | 5,0%         | 0%          | 95,0%        | 100%  |
| FC positifs++                   | 0%           | 0%          | 100%         | 100%  |
| FC positifs+++                  | 0%           | 0%          | 100%         | 100%  |

## 2. Relation entre le statut sérologique en I-ELISA et les PCR



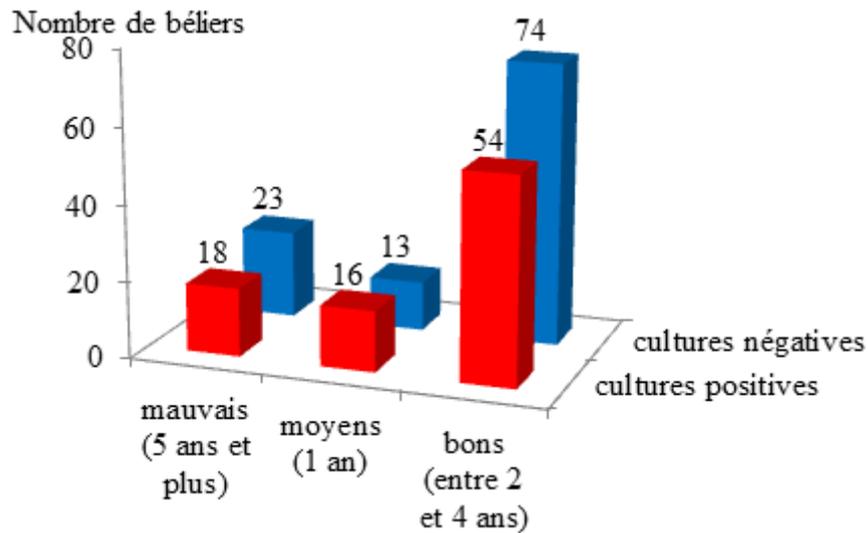
Graphique n°14 : relation entre statut sérologique en I-ELISA et PCR

Tableau n°54 : relation entre statut sérologique en I-ELISA et PCR, en pourcentage du total par catégories d'I-ELISA

| Pourcentages (catégories d'I-ELISA) | PCR négatifs | PCR douteux | PCR positifs | Total |
|-------------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------|
| I-ELISA négatifs                    | 5,3%         | 6,3%        | 88,4%        | 100%  |
| I-ELISA douteux                     | 18,2%        | 9,1%        | 72,7%        | 100%  |
| I-ELISA positifs+                   | 0%           | 0%          | 100%         | 100%  |
| I-ELISA positifs++                  | 0%           | 0%          | 100%         | 100%  |
| I-ELISA positifs+++                 | 0%           | 0%          | 100%         | 100%  |

**Annexe N°IV : relations entre les quatre paramètres cliniques (âge, NEC, CS et lésions) et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme (cultures)**

**1. Relation entre l'âge des béliers et les cultures**

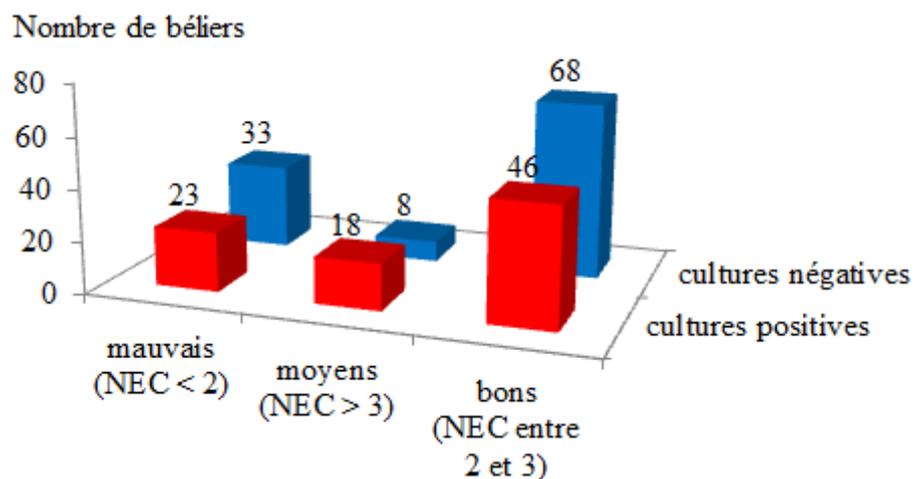


Graphes n°15 : relation entre âge des béliers et cultures

Tableau n°55 : relation entre âge des béliers et cultures, en pourcentage de l'effectif total

| Pourcentages (effectif total, n = 198) | Cultures positives | Cultures négatives | Total |
|--|--------------------|--------------------|-------|
| Mauvais (5 ans et plus)                | 9,1%               | 11,6%              | 20,7% |
| Moyens (1 an)                          | 8,1%               | 6,6%               | 14,6% |
| Bons (entre 2 et 4 ans)                | 27,3%              | 37,4%              | 64,6% |
| Total                                  | 44,4%              | 55,6%              | 100%  |

## 2. Relation entre les NEC des béliers et les cultures

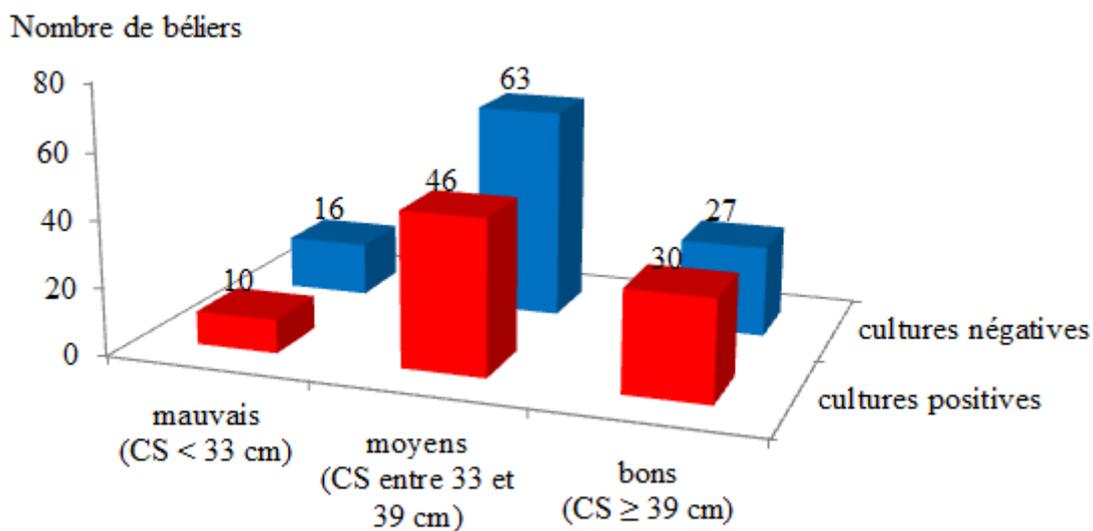


Graphique n°16 : relation entre NEC des béliers et cultures

Tableau n°56 : relation entre NEC des béliers et cultures, en pourcentage de l'effectif total

| Pourcentages<br>(effectif total, n = 196) | Cultures positives | Cultures négatives | Total |
|---|--------------------|--------------------|-------|
| Mauvais (NEC < 2)                         | 11,7%              | 16,8%              | 28,6% |
| Moyens (NEC > 3)                          | 9,2%               | 4,1%               | 13,3% |
| Bons (NEC entre 2 et 3)                   | 23,5%              | 34,7%              | 58,2% |
| Total                                     | 44,4%              | 55,6%              | 100%  |

### 3. Relation entre les CS des béliers et les cultures

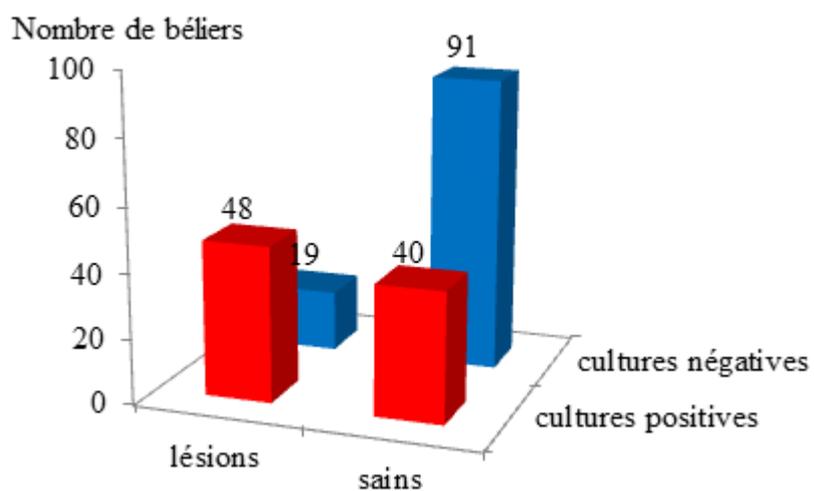


Graphe n°17 : relation entre CS des béliers et cultures

Tableau n°57 : relation entre CS des béliers et cultures, en pourcentage de l'effectif total

| Pourcentages<br>(effectif total, n = 192) | Cultures positives | Cultures négatives | Total |
|---|--------------------|--------------------|-------|
| Mauvais (CS < 33 cm)                      | 5,2%               | 8,3%               | 13,5% |
| Moyens (CS entre 33 et 39 cm)             | 24,0%              | 32,8%              | 56,8% |
| Bons (CS ≥ 39 cm)                         | 15,6%              | 14,1%              | 29,7% |
| Total                                     | 44,8%              | 55,2%              | 100%  |

#### 4. Relation entre les lésions de l'appareil génital et les cultures



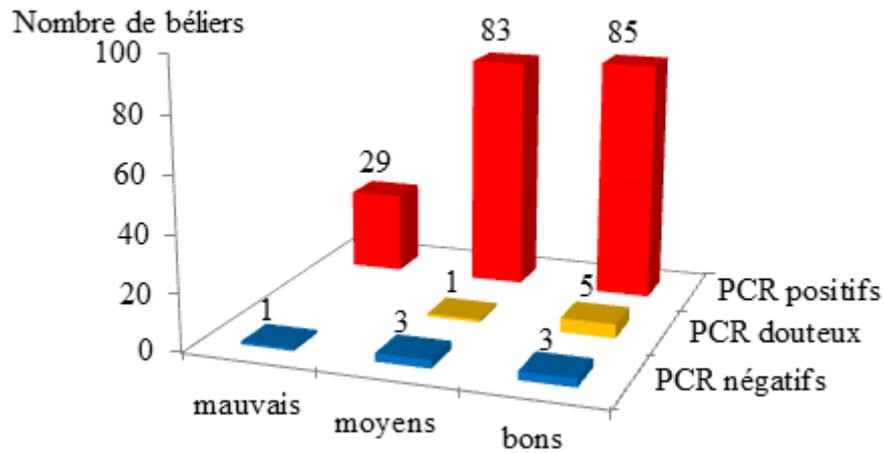
Graphique n°18 : relation entre lésions et cultures

Tableau n°58 : relation entre lésions et cultures, en pourcentage de l'effectif total

| Pourcentages<br>(effectif total, n = 198) | Cultures positives | Cultures négatives | Total |
|---|--------------------|--------------------|-------|
| Lésions                                   | 24,2%              | 9,6%               | 33,8% |
| Sains                                     | 20,2%              | 46,0%              | 66,2% |
| Total                                     | 44,4%              | 55,6%              | 100%  |

**Annexe N°V : relations entre statut clinique des béliers (score clinique, âge, NEC, CS et lésions de l'appareil génital) et excrétion de *B. ovis* dans le sperme (PCR)**

**1. Relation entre le statut clinique des béliers (score clinique) et les PCR**

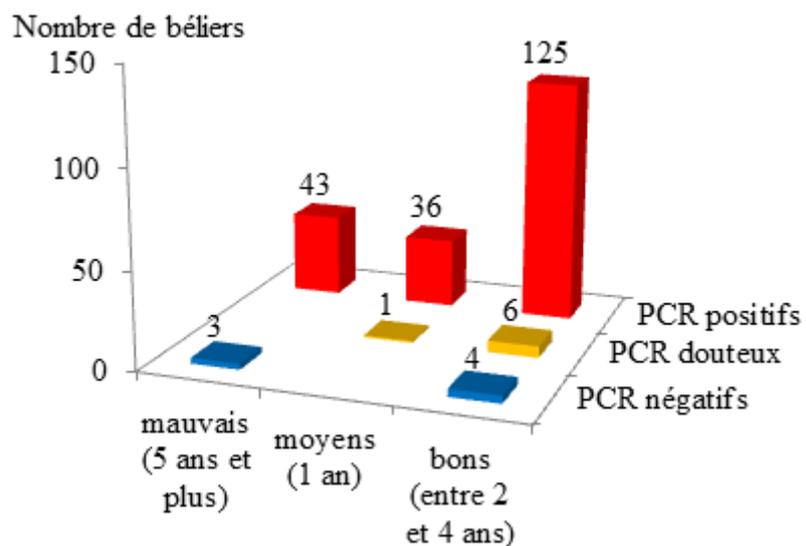


Graph n°19 : relation entre statut clinique des béliers (score clinique) et PCR

Tableau n°59 : relation entre statut clinique des béliers (score clinique) et PCR, en pourcentage du total par catégories de statut clinique

| Pourcentages (catégories de statut clinique) | PCR négatifs | PCR douteux | PCR positifs | Total |
|--|--------------|-------------|--------------|-------|
| Mauvais                                      | 3,2%         | 0%          | 96,8%        | 100%  |
| Moyens                                       | 3,4%         | 1,1%        | 95,4%        | 100%  |
| Bons   | 3,3%         | 5,4%        | 91,3%        | 100%  |

## 2. Relation entre l'âge des béliers et les PCR

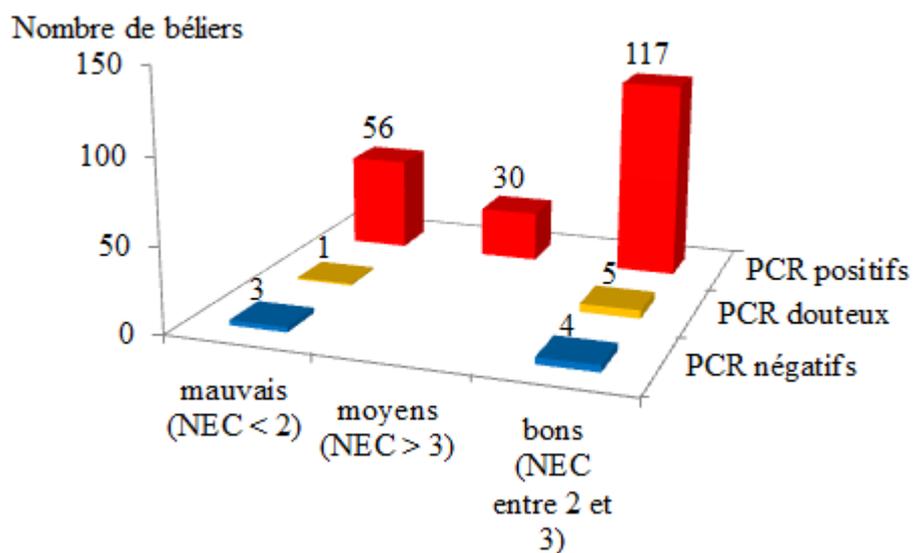


Graphique n°20 : relation entre âge des béliers et PCR

Tableau n°60 : relation entre âge des béliers et PCR, en pourcentage du total par catégories d'âges

| Pourcentages (catégories d'âge) | PCR négatifs | PCR douteux | PCR positifs | Total |
|---------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------|
| Mauvais (5 ans et plus)         | 6,5%         | 0%          | 93,5%        | 100%  |
| Moyens (1 an)                   | 0%           | 2,7%        | 97,3%        | 100%  |
| Bons (entre 2 et 4 ans)         | 3,0%         | 4,4%        | 92,6%        | 100%  |

### 3. Relation entre les NEC des béliers et les PCR

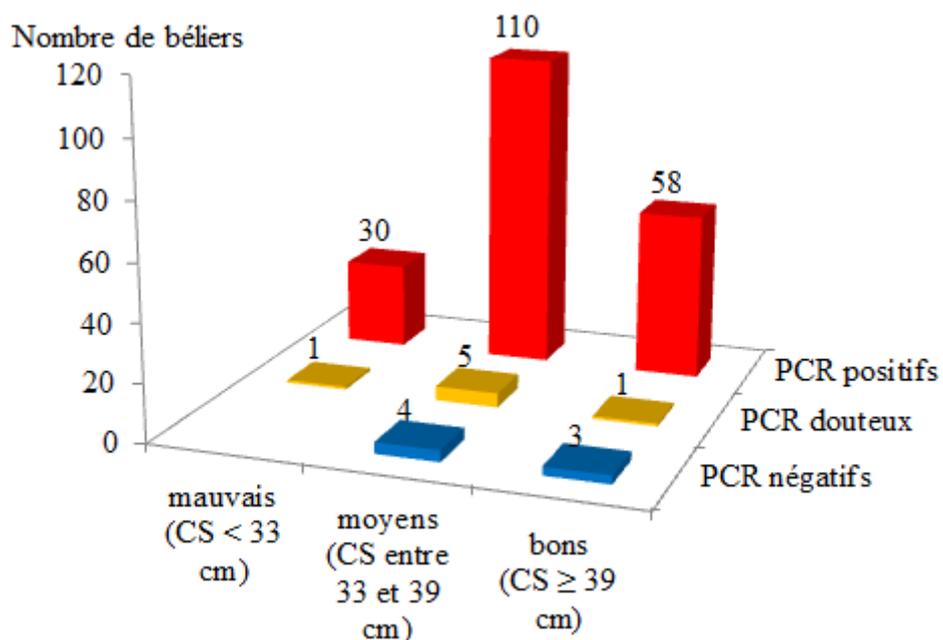


Graphe n°21 : relation entre NEC des béliers et PCR

Tableau n°61 : relation entre NEC des béliers et PCR, en pourcentage du total par catégories de NEC

| Pourcentages (catégories de NEC) | PCR négatifs | PCR douteux | PCR positifs | Total |
|----------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------|
| Mauvais (NEC < 2)                | 5,0%         | 1,7%        | 93,3%        | 100%  |
| Moyens (NEC > 3)                 | 0%           | 0%          | 100%         | 100%  |
| Bons (NEC entre 2 et 3)          | 3,2%         | 4,0%        | 92,9%        | 100%  |

#### 4. Relation entre les CS des béliers et les PCR

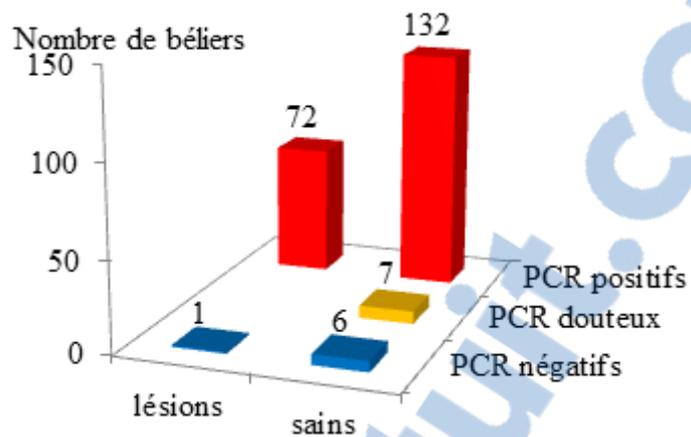


Graph n°22 : relation entre CS des béliers et PCR

Tableau n°62 : relation entre CS des béliers et PCR, en pourcentage du total par catégories de CS

| Pourcentages (catégories de CS) | PCR négatifs | PCR douteux | PCR positifs | Total |
|---------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------|
| Mauvais (CS < 33 cm)            | 0%           | 3,2%        | 96,8%        | 100%  |
| Moyens (CS entre 33 et 39 cm)   | 3,4%         | 4,2%        | 92,4%        | 100%  |
| Bons (CS ≥ 39 cm)               | 4,8%         | 1,6%        | 93,5%        | 100%  |

## 5. Relation entre les lésions de l'appareil génital et les PCR



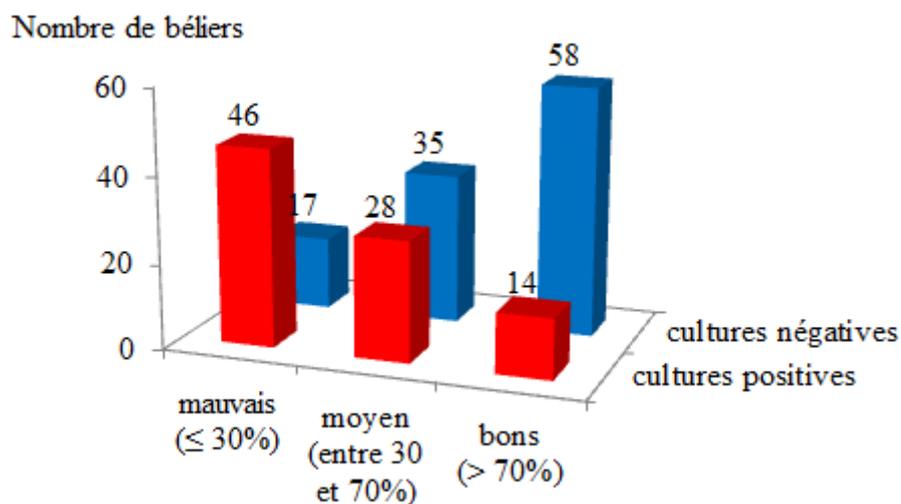
Graphique n°23 : relation entre lésions de l'appareil génital et PCR

Tableau n°63 : relation entre lésions de l'appareil génital et PCR, en pourcentage du total par catégories de lésions

| Pourcentages (catégories de lésions) | PCR négatifs | PCR douteux | PCR positifs | Total |
|--------------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------|
| Lésions                              | 1,4%         | 0%          | 98,6%        | 100%  |
| Sains                                | 4,1%         | 4,8%        | 91,0%        | 100%  |
| Total                                | 3,2%         | 3,2%        | 93,6%        | 100%  |

**Annexe N°VI : relations entre les trois paramètres séminologiques (motilité individuelle, quantité de spermatozoïdes par éjaculat, anomalies des spermatozoïdes) et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme (cultures)**

**1. Relation entre les motilités individuelles des béliers et les cultures**

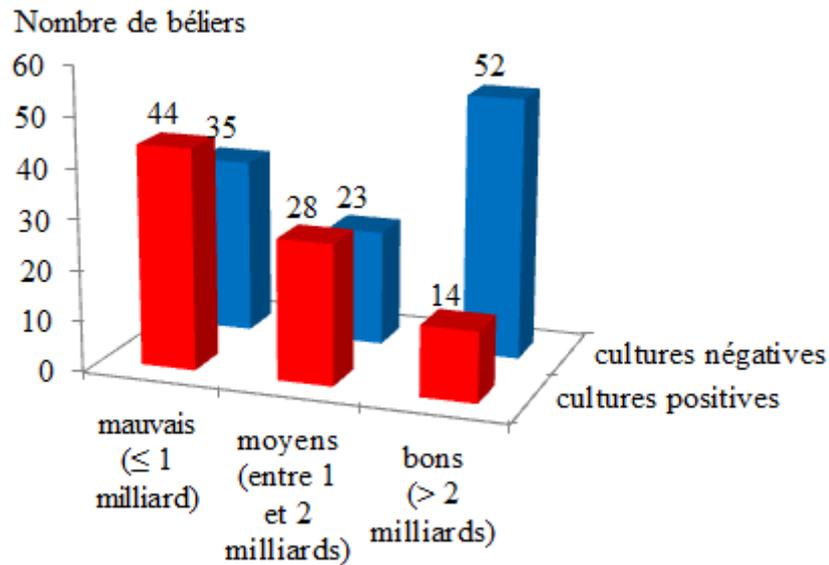


Graphique n°24 : relation entre motilités individuelles des béliers et cultures

Tableau n°64 : relation entre motilités individuelles des béliers et cultures, en pourcentage de l'effectif total

| Pourcentages (effectif total, n = 198) | Cultures positives | Cultures négatives | Total |
|--|--------------------|--------------------|-------|
| Mauvais (≤ 30%)                        | 23,2%              | 8,6%               | 31,8% |
| Moyen (entre 30 et 70%)                | 14,1%              | 17,7%              | 31,8% |
| Bons (> 70%)                           | 7,1%               | 29,3%              | 36,4% |
| Total                                  | 44,4%              | 55,6%              | 100%  |

## 2. Relation entre les quantités de spermatozoïdes par éjaculat et les cultures

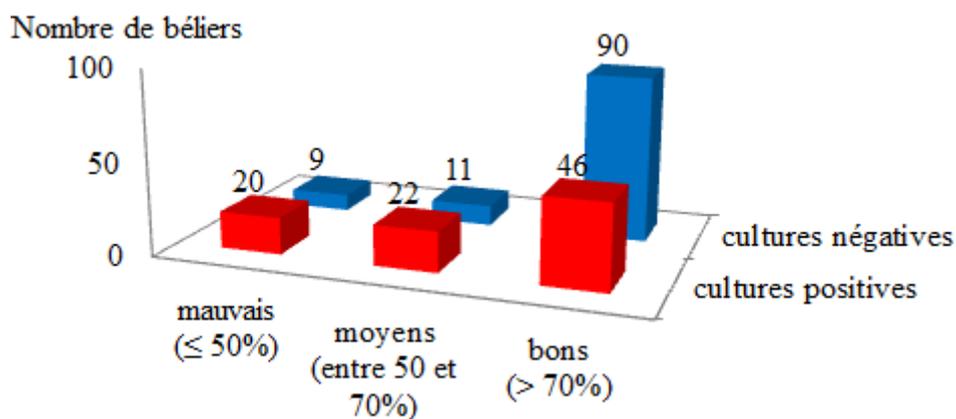


Graph n°25 : relation entre quantités de spermatozoïdes par éjaculat et cultures

Tableau n°65 : relation entre quantités de spermatozoïdes par éjaculat et cultures, en pourcentage de l'effectif total

| Pourcentages<br>(effectif total, n = 196) | Cultures positives | Cultures négatives | Total |
|---|--------------------|--------------------|-------|
| Mauvais ( $\leq 1$ milliard)              | 22,4%              | 17,9%              | 40,3% |
| Moyens (entre 1 et 2 milliards)           | 14,3%              | 11,7%              | 26,0% |
| Bons ( $> 2$ milliards)                   | 7,1%               | 26,5%              | 33,7% |
| Total                                     | 43,9%              | 56,1%              | 100%  |

### 3. Relation entre les anomalies des spermatozoïdes et les cultures



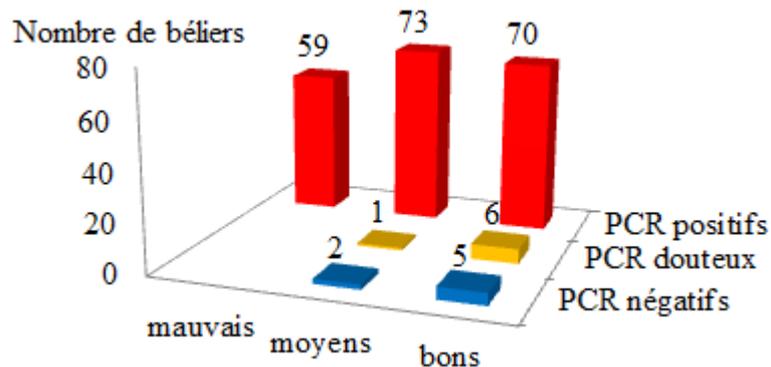
Graphe n°26 : relation entre anomalies des spermatozoïdes (pourcentage de spermatozoïdes normaux) et cultures

Tableau n°66 : relation entre anomalies des spermatozoïdes (pourcentage de spermatozoïdes normaux) et cultures, en pourcentage de l'effectif total

| Pourcentages<br>(effectif total, n = 198) | Cultures positives | Cultures négatives | Total |
|---|--------------------|--------------------|-------|
| Mauvais (≤ 50%)                           | 10,1%              | 4,5%               | 15%   |
| Moyens (entre 50 et 70%)                  | 11,1%              | 5,6%               | 17%   |
| Bons (> 70%)                              | 23,2%              | 45,5%              | 69%   |
| Total                                     | 44,4%              | 55,6%              | 100%  |

**Annexe N°VII : relations entre le statut séminologique des béliers (score séminologique, motilité individuelle, quantité de spermatozoïdes par éjaculat et anomalies des spermatozoïdes) et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme (PCR)**

**1. Relation entre le statut séminologique des béliers (score séminologique) et les PCR**

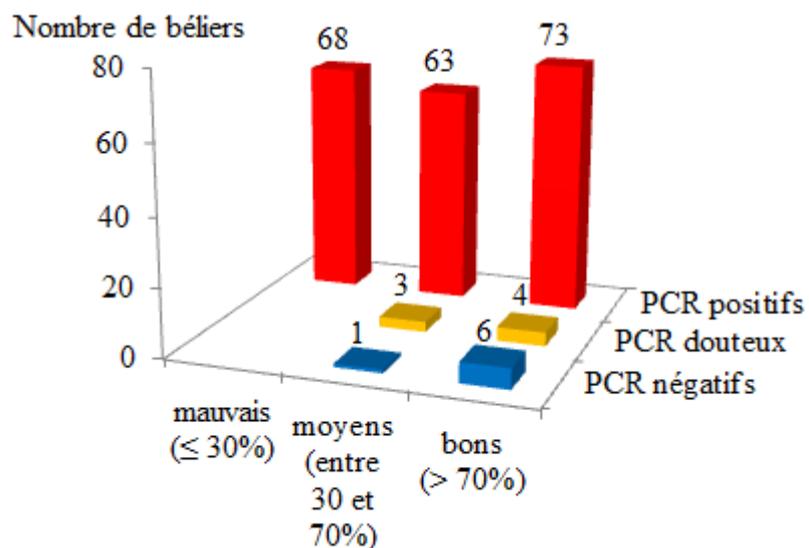


Graphique n°27 : relation entre qualité de la semence (score séminologique) et PCR

Tableau n°67 : relation entre qualité de la semence (score séminologique) et PCR, en pourcentage par catégories de statut séminologique

| Pourcentages (catégories de score séminologique) | PCR négatifs | PCR douteux | PCR positifs | Total |
|--|--------------|-------------|--------------|-------|
| Mauvais  | 0%           | 0%          | 100%         | 100%  |
| Moyens   | 2,6%         | 1,3%        | 96,1%        | 100%  |
| Bons   | 6,2%         | 7,4%        | 86,4%        | 100%  |

## 2. Relation entre les motilités individuelles des béliers et les PCR

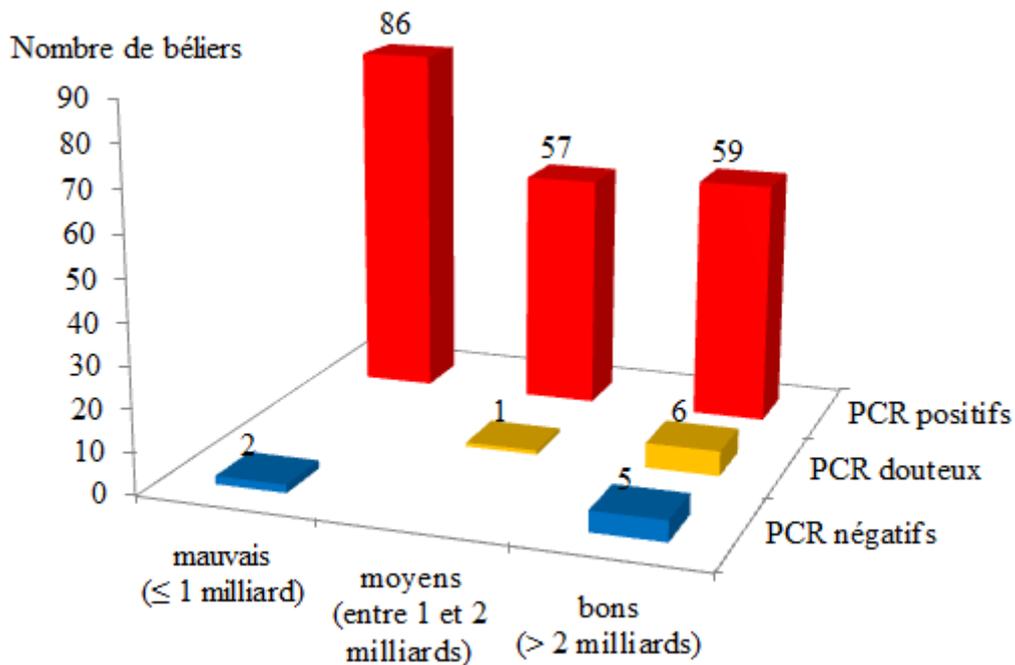


Graphique n°28 : relation entre motilités individuelles des béliers et PCR

Tableau n°68 : relation entre motilités individuelles des béliers et PCR, en pourcentage du total par catégories de motilité individuelle

| Pourcentages<br>(catégories de motilité individuelle) | PCR<br>négatifs | PCR<br>douteux | PCR<br>positifs | Total |
|---|-----------------|----------------|-----------------|-------|
| Mauvais ( $\leq 30\%$ )                               | 0%              | 0%             | 100%            | 100%  |
| Moyens (entre 30 et 70%)                              | 1,5%            | 4,5%           | 94,0%           | 100%  |
| Bons ( $> 70\%$ )                                     | 7,2%            | 4,8%           | 88,0%           | 100%  |

### 3. Relation entre la quantité de spermatozoïdes par éjaculat et les PCR

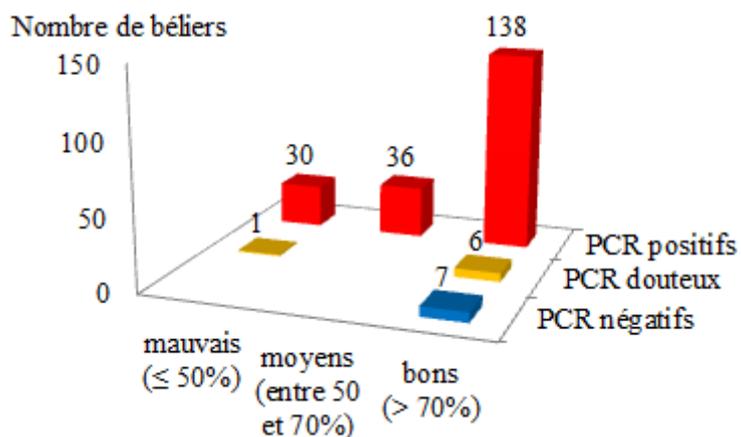


Graphique n°29 : relation entre quantité de spermatozoïdes par éjaculat et PCR

Tableau n°69 : relation entre quantité de spermatozoïdes par éjaculat et PCR, en pourcentage du total par catégories de quantité de spermatozoïdes par éjaculat

| Pourcentages<br>(catégories de quantité de spermatozoïdes par éjaculat) | PCR négatifs | PCR douteux | PCR positifs | Total |
|---|--------------|-------------|--------------|-------|
| Mauvais (≤ 1 milliard)  | 2,3%         | 0%          | 97,7%        | 100%  |
| Moyens (entre 1 et 2 milliards)   | 0%           | 1,7%        | 98,3%        | 100%  |
| Bons (> 2 milliards)  | 7,1%         | 8,6%        | 84,3%        | 100%  |

#### 4. Relation entre les anomalies des spermatozoïdes et les PCR



Graphique n°30 : relation entre anomalies des spermatozoïdes (pourcentage de spermatozoïdes normaux) et PCR

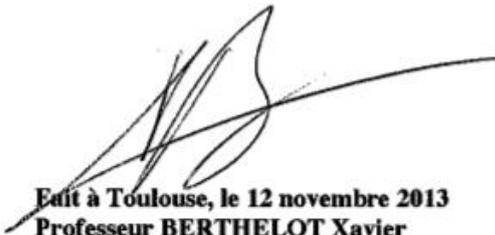
Tableau n°70 : relation entre anomalies des spermatozoïdes (pourcentage de spermatozoïdes normaux) et PCR, en pourcentage du total par catégories d'anomalies des spermatozoïdes

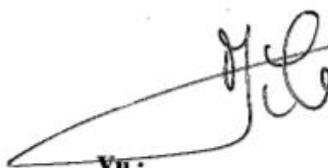
| Pourcentages (catégories d'anomalies des spermatozoïdes) | PCR négatifs | PCR douteux | PCR positifs | Total |
|--|--------------|-------------|--------------|-------|
| Mauvais (≤ 50%)  | 0%           | 3,2%        | 96,8%        | 100%  |
| Moyens (entre 50 et 70%)                                 | 0%           | 0%          | 100%         | 100%  |
| Bons (> 70%)   | 4,6%         | 4,0%        | 91,4%        | 100%  |

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

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

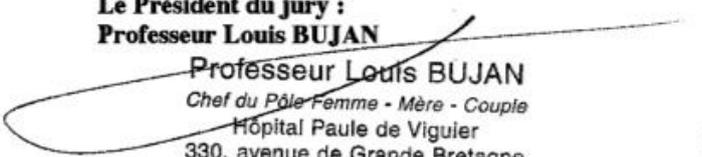
Je soussigné, **Xavier BERTHELOT**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **SCHUSTER Aude** intitulée « *L'épididymite contagieuse du bélier en région Provence Alpes Côte d'Azur : étude des relations entre paramètres cliniques, paramètres sémiologiques, statut sérologique vis-à-vis de Brucella ovis et excrétion de la bactérie dans le sperme.* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

  
Fait à Toulouse, le 12 novembre 2013  
Professeur BERTHELOT Xavier  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

  
Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain MILON



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Louis BUJAN

  
Professeur Louis BUJAN  
Chef du Pôle Femme - Mère - Couple  
Hôpital Paule de Viguier  
330, avenue de Grande Bretagne  
TSA 70034  
31059 TOULOUSE Cedex 9

Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Professeur Bertrand MONTHUBERT



  
Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
Le vice-Président du CEVU

Arnaud LE PADELLEC

**Melle SCHUSTER Aude**  
a été admis(e) sur concours en : 2008  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 21/06/2012  
a validé son année d'approfondissement le : 12/07/2013  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

SCHUSTER Aude

Titre : l'épididymite contagieuse du bélier en région Provence Alpes Côte d'Azur : étude des relations entre paramètres cliniques, paramètres séminologiques, statut sérologique vis-à-vis de *Brucella ovis* et excrétion de la bactérie dans le sperme.

Résumé :

L'épididymite contagieuse du bélier, due à *Brucella ovis*, est responsable de problèmes de reproduction en élevage ovin. Début septembre 2012, face à une situation préoccupante en région Provence Alpes Côte d'Azur (PACA), a été réalisée une étude portant sur 218 béliers issus de troupeaux infectés de cette région. Cette thèse présente les résultats concernant les relations entre le statut clinique, séminologique et sérologique des béliers et l'excrétion de *B. ovis* dans le sperme, évaluée par mise en culture de la semence et par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR). Nous avons constaté que la majorité des béliers excréteurs étaient séropositifs en Fixation du Complément (FC) et en ELISA Indirect (I-ELISA), présentaient des lésions de l'appareil génital et avaient une semence de mauvaise qualité. Malgré d'importants biais expérimentaux, cette étude a permis de proposer un plan de réforme des béliers et a contribué à sensibiliser les éleveurs sur l'impact économique et sanitaire de cette affection dans leurs troupeaux.

Mots-clés : épididymite contagieuse – *Brucella ovis* – bélier – excrétion spermatique – sérologie – ELISA – fixation du complément – bactériologie – PCR

Title: Ram epididymitis in the Provence Alpes Côte d'Azur region: relationship between clinical and seminological parameters, serological tests for the detection of *Brucella ovis* and the excretion of the bacterium in the sperm.

Abstract:

Ram epididymitis, caused by *Brucella ovis*, is responsible for reproduction problems within the ovine flock. At the beginning of September 2012, because of a worrying situation within the Provence Alpes Côte d'Azur (PACA) region, a study was performed on 218 rams from infected flock of this region. This thesis presents the results on the relationship between clinical, seminological and serological status of rams and the excretion of *B. ovis* in the sperm, tested from bacterial culture of the sperm and the Polymerase Chain Reaction (PCR). The majority of rams who had *B. ovis* in their sperm were serologically positive with both tests, Complement Fixation (CF) and Indirect ELISA (I-ELISA); they showed lesions on their reproductive organs and a sperm of bad quality. In spite of experimental biases, after the analysis of this study, we have been able to offer a reform plan to breeders, hoping that they were now sensitive to the economic and sanitary impact of this disease on their flock.

Keywords: ram epididymitis – *Brucella ovis* – ram – seminal excretion – serology – ELISA – complement fixation – bacteriology – PCR